

Untersuchungen zur Kenntnis wichtiger Abbauewege
von Zuckern

D I S S E R T A T I O N

der
Fakultät Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Otto Pachmayr
aus München

München 1986

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Th. Severin

2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Eiden

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Juni 1986

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie
und Lebensmittelchemie der Ludwig-Maximilians-Universität
München auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Professor Dr. Theodor Severin

angefertigt. Für die grosszügige Unterstützung und
Förderung dieser Arbeit, sowie für seine stetige
Diskussionsbereitschaft danke ich Herrn
Professor Severin ganz herzlich.

Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle auch
bei Herrn Dr. Franz Ledl bedanken, der durch seine
wertvollen Ratschläge und engagierte Diskussionen die
Durchführung dieser Arbeit stets unterstützt hat.

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Theoretischer Teil	Seite
A. Einleitung	1
B. Abbauege von Zuckern	3
1. Einführung	3
2. Untersuchungen zum 1-Desoxyabbaueg	9
2.1. γ -Pyrone und γ -Pyridone	9
2.2. 2,3-Dihydro- γ -pyrone	21
2.3. Cyclopent [b]azepinderivate	25
2.4. Acetylformoin und verwandte Aromastoffe	30
2.5. Pyrrolinonreduktone	37
2.6. Aminohexosereduktone	42
2.7. 2,3-Dihydro-1H-pyrrolizine	46
3. Untersuchungen zum 3-Desoxyabbaueg	47
3.1. Hydroxymethylfurfural und analoge Formylpyrrole	47
3.2. N-Alkyl-3-oxypyridiniumbetaine	51
3.2.1. Einleitung	51
3.2.2. Isolierung und Nachweismethoden	55
3.2.3. Bildung aus verschiedenen Zuckern und Aminen	60
3.2.4. Reaktivität und Folgeprodukte	64
3.2.5. Bildungsmechanismus	70
3.3. Prolinspezifische Reaktionsprodukte	71

	Seite
4. Untersuchungen zum 4-Desoxyabbauweg	75
4.1. Hydroxyacetylfuran	75
4.2. Isomere 3-Oxypyridiniumbetaine	78
5. Halbquantitative Untersuchungen zur Bedeutung der einzelnen Abbauwege	80
5.1. Einleitung	80
5.2. Karamellisierung von Glucose	81
5.3. Umsetzungen von Glucose mit primären Aminen	86
5.4. Abschliessende Betrachtungen	91
C. Zusammenfassung	94

Experimenteller Teil

I. Allgemeine Angaben	100
II. Spezielle Arbeitsmethoden	102
1. Untersuchungen zum 1-Desoxyabbauweg	102
1.1. Ausgangs- und Vergleichssubstanzen	102
1.2. Herstellung von Acetylmaltosin <u>8d</u>	105
1.3. Nachweis von <u>8c</u> am Aminosäureanalysator	106
1.4. Isolierung von <u>8d</u> aus Umsetzungen von Disacchariden mit N [~] -Acetyllysin	107
1.5. Herstellung von <u>8e</u>	108
1.6. Umsetzung von <u>8d</u> mit Diazomethan	108

	Seite
1.7. Isolierung der Verbindungen <u>16a</u> und <u>16b</u>	109
1.8. Reduktion von <u>16a</u> zu <u>16b</u>	110
1.9. Isolierung von <u>17a</u> aus einem Umsetzungsgemisch von Acetylformoin <u>20</u> mit Prolin	110
1.10. Herstellung von <u>22</u> aus Acetylformoin <u>20</u>	111
1.11. Nachweis von <u>22</u> in einem Umsetzungsgemisch von Cystein mit 1-Desoxy-1-piperidino-fructose	112
1.12. Herstellung von <u>24</u>	112
1.13. Isolierung von <u>26</u> und Nachweis von <u>25</u>	113
1.14. Anreicherung von <u>29</u> aus einer Umsetzung von Acetylformoin mit Glycin	114
1.15. Herstellung der Verbindungen <u>32</u> und <u>34</u>	115
1.16. Herstellung von <u>33</u>	116
1.17. Versuch der Cyclisierung von <u>32</u> , <u>33</u> , und <u>34</u> mit Natriumdithionit	116
1.18. Dünnschichtchromatographischer Nachweis von <u>39</u> in einem Acetylformoin/Prolin-Reaktionsge- misch	116
1.19. Isolierung und Nachweis von <u>40</u> in erhitzten Mischungen von Prolin und Acetylformoin	117

	Seite
2. Untersuchungen zum 3-Desoxyabbauweg	118
2.1. Ausgangs- und Vergleichssubstanzen	118
2.2. Herstellung von Verbindung <u>49a</u>	118
2.3. Synthese von <u>49b</u>	119
2.4. Isolierung von <u>49a</u> bzw. <u>49b</u> aus Umsetzungsge- mischen von Zuckern mit Methylammoniumacetat	121
2.5. Herstellung von <u>49c</u> aus HMF	123
2.6. Isolierung von <u>49c</u> aus einer Umsetzung von Glucose mit N ^α -Acetyllysin	124
2.7. Nachweis von <u>49d</u> am Aminosäureanalysator	124
2.8. Isolierung von <u>49e</u> nach Erhitzen von <u>49a</u> in DMF	125
2.9. Oxidation von <u>49a</u> zu <u>49e</u> mit Braunstein	125
2.10. Isolierung einer unbekannten Verbindung mit der Molekularmasse 208 nach Erhitzen von <u>49a</u> in DMF	126
2.11. Isolierung von <u>51</u>	127
2.12. Herstellung von <u>52</u> über <u>53</u>	127
2.13. Katalytische Reduktion von <u>49a</u> zu <u>58</u>	128
2.14. Reduktion von <u>49a</u> zu <u>58</u> mit NaBH ₄	129
2.15. Gaschromatographischer Nachweis von <u>58</u> in ei- nem katalytisch hydrierten Bräunungsgemisch der Reaktion von Glucose mit Methylamin	129
2.16. Isolierung einer unbekannten Verbindung mit der Molekularmasse 287 aus einer Umsetzung von HMF <u>41</u> mit Prolin	

	Seite
3. Untersuchungen zum 4-Desoxyabbauweg	131
3.1. Ausgangs- und Vergleichssubstanzen	131
3.2. Isolierung von <u>49f</u> aus einem Umsetzungsgemisch von 2-Hydroxyacetylfuran und Methylammonium- acetat	131
3.3. Synthese von <u>49f</u>	132
4. Gaschromatographische Untersuchungen zur Bestim- mung von Hauptprodukten in Bräunungsgemischen	133
4.1. Vergleichssubstanzen	133
4.2. Allgemeine Derivatisierungsverfahren	134
4.3. Untersuchungsmethoden	134
4.4. Karamellisierung von Glucose	135
4.5. Isolierung und Reinigung von <u>68</u> und <u>69</u>	136
4.6. Umsetzungen von Glucose mit primären Aminen	137
Literaturangaben	139
Lebenslauf	150

THEORETISCHER TEIL

A. Einleitung

Die Maillard-Reaktion ist seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschungstätigkeit (1). Der Schwerpunkt der Untersuchungen liegt dabei heute nicht mehr nur bei den Bräunungsprodukten die, wie L.C. Maillard bereits 1912 (2) beschrieb, beim Erhitzen von Zuckern mit Aminosäuren entstehen; vielmehr gilt das Interesse inzwischen auch ganz anderen Aspekten dieses Reaktionstyps, unter dem man heute allgemein die Reaktion von Carbonylverbindungen mit Amin-komponenten zusammenfasst.

So ist die Bildung von Aromastoffen im Verlauf der Maillard-Reaktion bereits früh in ihrer Bedeutung erkannt und dementsprechend gründlich untersucht worden (3-7). Ebenso weiss man schon lange, dass bei der Reaktion von Zuckern mit Aminen auch Reduktone entstehen können, die durch Ihre antioxidative Wirkung wesentlich zur verbesserten Haltbarkeit erhitzter Lebensmittel beitragen (8,9). Während der Nährwertverlust von Lebensmitteln z.B. durch die Umwandlung essentieller Aminosäuren schon länger bekannt ist (10-12), sind andere medizinische Aspekte der Maillard-Reaktion erst seit kurzem in den Mittelpunkt mancher Untersuchungen getreten. So entdeckte man, dass bei bestimmten Bräunungsumsetzungen mutagene und zum Teil sogar carcinogene Substanzen entstehen können (13,14).

Ob aber tatsächlich von einer gesundheitlichen Gefährdung durch erhitzte Lebensmittel ausgegangen werden kann, erscheint zur Zeit noch fraglich (1,15).

Nicht nur die eventuellen toxischen Auswirkungen sind aber von medizinischem Interesse, sondern es mehren sich auch Befunde über die Maillard-Reaktion "in vivo" (16-18). Es zeigt sich, dass im Körper ablaufende Reaktionen von Zuckern mit Aminkomponenten von zunehmender Bedeutung z.B. in der Diabetesforschung sein werden. So wird die Maillard-Reaktion von manchen Forschern nicht nur für die Bildung des grauen Stars, sondern sogar für eine langsame "Verzuckerung" des Menschen mit zunehmendem Alter verantwortlich gemacht (19).

Um die Schwierigkeiten, die durch die äusserst komplexe Matrix von Lebensmitteln oder auch des menschlichen Gewebes bedingt sind, zu umgehen, werden Untersuchungen über die Grundlagen der Maillard-Reaktion in der Regel anhand von Modellumsetzungen durchgeführt. Diese lassen Rückschlüsse auf Reaktionsmechanismen im Lebensmittel zu, die sich dann auch oft bestätigen lassen. Dadurch hat man heute schon ein recht genaues Bild von den ersten Stufen wie auch von allgemeinen Reaktionsprinzipien der Maillard-Reaktion bekommen (21-24).

Ziel dieser Arbeit war es nun, wichtige, im weiteren Verlauf der Maillard-Reaktion entstehende Zuckerabbauprodukte zu erfassen. Es sollten aber nicht nur die, schon oftmals untersuchten, leichtflüchtigen und aromagebenden Verbindungen bestimmt werden, sondern das Augenmerk richtete sich vor allem auf die Bildung polarer und nicht flüchtiger Produkte. Aufgrund der Schwierigkeiten in der Analytik sind die Kenntnisse über diese Verbindungsklasse noch relativ gering. Dass dabei bisher noch nicht beschriebene Strukturen von besonderem Interesse waren, ist selbstverständlich. Insbesondere soll diese Arbeit zeigen, ob bereits bekannte Zuckerabbauprodukte unter den Bedingungen der Maillard-Reaktion zu noch unbekannten Folgeprodukten reagieren, die letztendlich eventuell in Lebensmitteln nachgewiesen werden können.

B. Abbauege von Zuckern

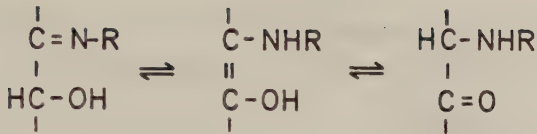
1. Einführung

Reduzierende Zucker reagieren mit Aminen zu einer Vielzahl von verschiedenen Verbindungen. Obwohl das Spektrum der entstehenden Strukturen fast alle bekannten Heterocyclen mit den unterschiedlichsten Substituenten umfasst, kann die erste Phase der Maillard-Reaktion doch in einem einheitlichen Schema zusammengefasst werden (21-25).

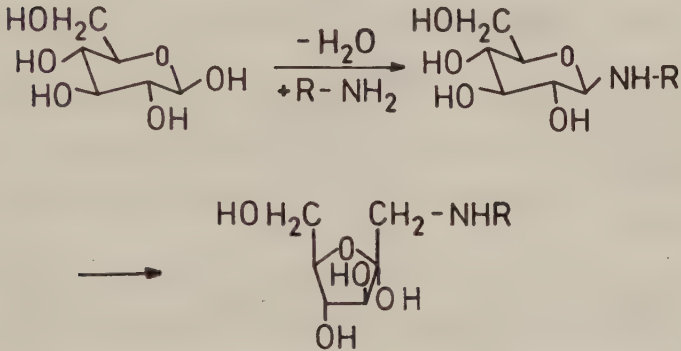
Danach reagieren Zucker mit Aminen über die Glycosylamine unter Umlagerung zu Aminoazuckern, die wiederum unter Abspaltung des Amins zu reaktiven α -dicarbonylverbindungen disproportionieren. In diesen ersten Schritten hat folglich das Amin, das primär oder sekundär und damit eine Aminosäure, ein Protein, Peptid oder auch ein freies Amin sein kann, lediglich katalytische Funktion.

Die Vielfalt der weiterhin entstehenden Produkte ergibt sich aus zahlreichen Folgereaktionen, die meist über Wasserabspaltung, Tautomerisierung und Redoxreaktionen, in manchen Fällen aber auch über Umlagerungen und Hydridverschiebungen zu teilweise sehr reaktiven Zwischenverbindungen führen. Diese bilden nun unter Kondensations- oder Additionsreaktionen mit einer Amin- oder anderen Heterofunktion (Alkohol, Carbonylverbindung, Thiol etc.) das breite Spektrum der bekannten Heterocyclen aber auch der noch weitgehend unbekannten polymeren Pigmente.

Glycosylamine können leicht aus Zuckern und Aminen gebildet werden. Das ist verständlich, wenn man bedenkt, dass es sich dabei um N,O-Acetale der Zuckercarbonylfunktion handelt, die in der offenkettigen Form als Imine vorliegen. Durch Tautomerisierung kommt es nun zur sogenannten Amadoriumlagerung im Falle von Aldosen bzw. zur Heyns-Carson Umlagerung bei Ketosen. In beiden Fällen werden n-Desoxy-n-aminozucker gebildet:



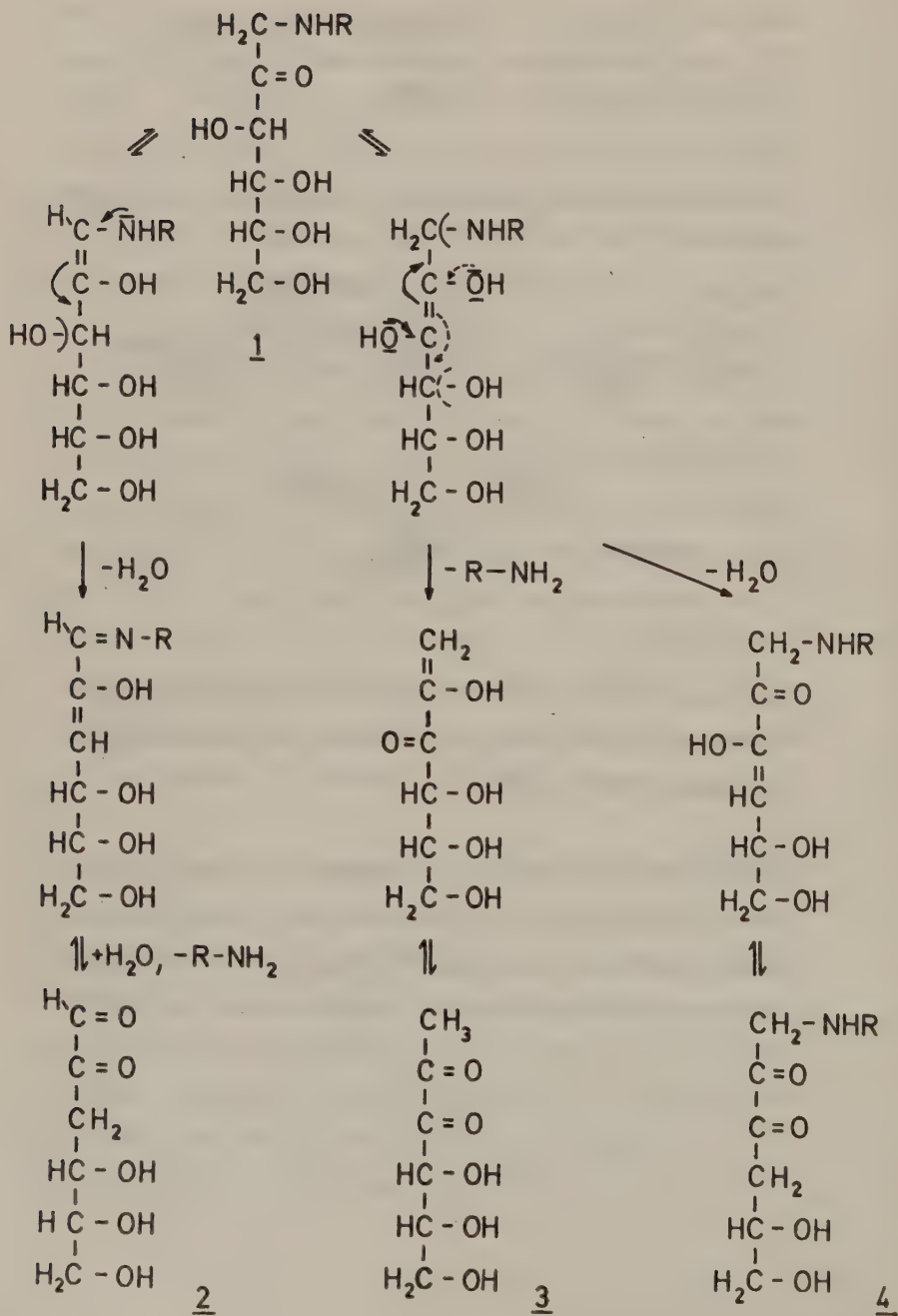
So entsteht z.B. aus Glucose eine 1-Desoxy-1-aminofructose :



Diese sogenannten Amadoriprodukte sind vergleichsweise stabil und konnten bereits in zahlreichen Lebensmitteln nachgewiesen werden (26).

Die Weiterreaktion der Amadoriverbindungen erfolgt über eine erneute Keto-Enol Tautomerisierung, wobei die Enolisierung nach zwei Richtungen erfolgen kann. Am Beispiel der 1-Desoxy-1-aminofructose 1 sei dies kurz erläutert:

Abbildung 1



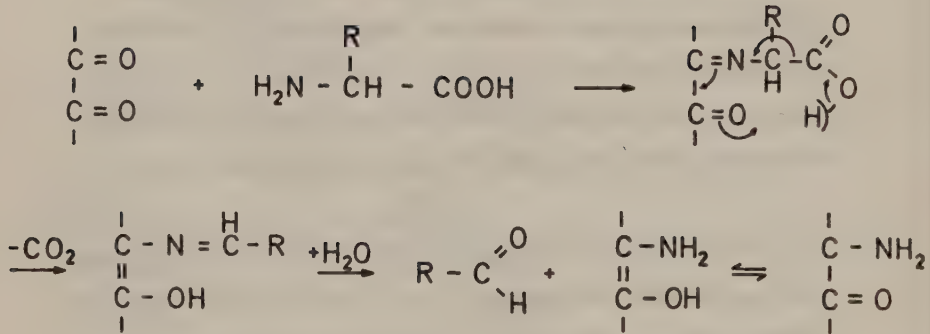
Je nach Lage der Doppelbindung kommt es anschliessend zur Abspaltung der Heterofunktion am C¹, C³ oder auch C⁴. Dies wird durch den Elektronenschub der zur Abgangsgruppe β -ständigen alkoholischen bzw. Aminofunktion gefördert. Die resultierenden 1-, 3- bzw. 4-Desoxyzucker 2-4 sind wichtige Zwischenstufen, die bei der Bildung der meisten bekannten Reaktionsprodukte durchlaufen werden.

Kompliziert wird das Spektrum der entstehenden Strukturen noch durch zwei Reaktionen, die im Verlaufe der Zuckermwandlung in das Geschehen eingreifen können.

Besonders bei hohen pH-Werten, aber auch im Säuren kommt es zur C,C-Spaltung aufgrund von Retroaldolreaktionen (27). Die dabei entstehenden C²- bis C⁴- Bruchstücke weisen als Hydroxycarbonylverbindungen die charakteristischen Zuckermerkmale auf, sind aber wesentlich reaktiver als Pentosen bzw. Hexosen.

Weiterhin stellen die gebildeten Desoxyzucker α -Dicarbonylverbindungen dar, die mit Aminosäuren über den sogenannten Streckerabbau reagieren können. Im Verlauf dieser, in Abbildung 2 dargestellten Reaktion, wird unter Decarboxylierung und Abspaltung des "Streckeraldehyds" Ammoniak reaktiv in das Zuckermolekül eingebaut.

Abbildung 2



Trotz dieser Nebenreaktionen, die das Gesamtbild der Mailardreaktion manchmal etwas uneinheitlich erscheinen lassen, sind doch die meisten der bekannten Produkte in einen der 3 aufgezeigten Hauptabbauwege einzuordnen. Im folgenden werde ich die verschiedenen Wege des Zuckerabbaus im einzelnen näher erläutern und auf neue Forschungsergebnisse im besonderen eingehen.

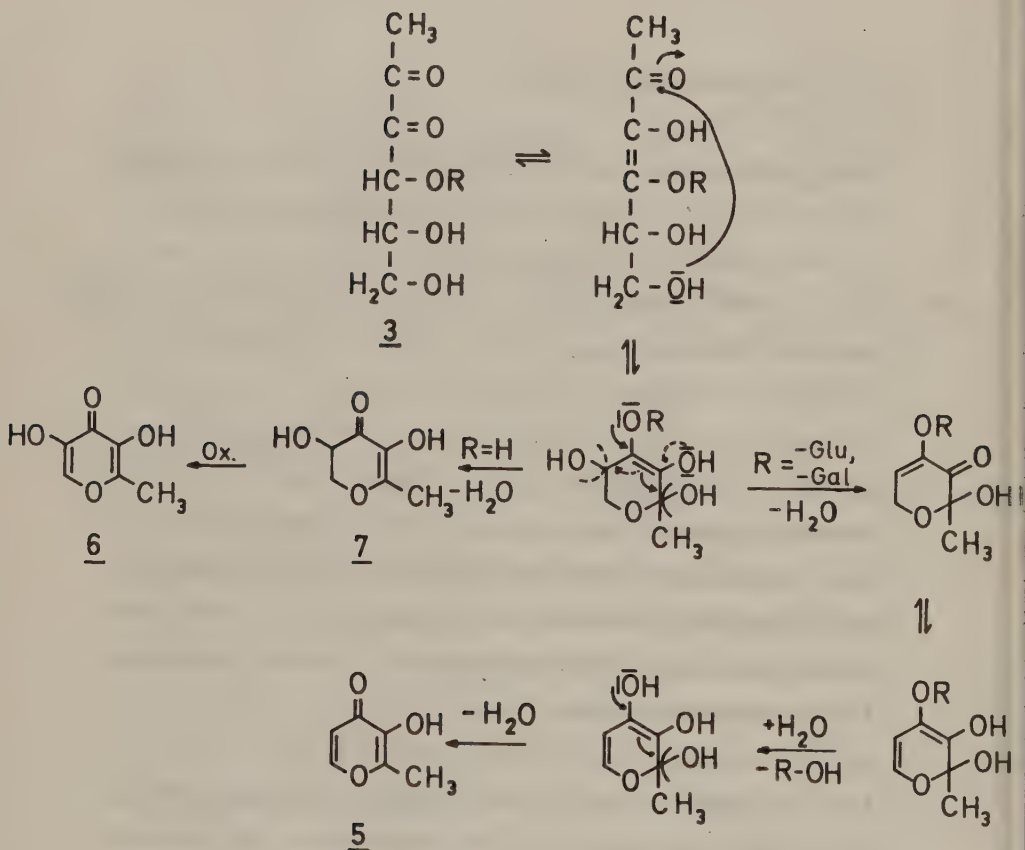
2. Untersuchungen zum 1-Desoxyabbauweg

2.1. γ -Pyrone und γ -Pyridone

Eines der bekanntesten Produkte der Maillardreaktion wurde bereits knapp 20 Jahre vor den Untersuchungen Maillard's (2) aus einem "Bräunungsansatz", dem Malz isoliert (28). Die Identität dieses Stoffes mit dem, 1862 entdeckten (29) und 1905 (30) strukturell aufgeklärten Naturprodukt Maltol 5 erkannten Erdmann und Schäfer, die Maltol aus erhitzter Stärke bzw. Cellulose erhielten (31). Der Bekanntheitsgrad dieser Verbindung beruht dabei weniger darauf, dass sie in besonders grosser Menge entsteht, als vielmehr darauf, dass die Substanz leicht durch Sublimation und Kristallisation gereinigt werden kann. So konnte Maltol auch schon verhältnismässig früh in Lebensmitteln wie z.B. Brotkruste (32) nachgewiesen werden.

Aus dem folgenden Reaktionsablauf geht hervor, dass Maltol als γ -Pyron im Gegensatz zu den β -Pyranonen, die kürzlich von Ledl, Hiebl und Severin beschrieben wurden (33), über den 1-Desoxyzucker 3 gebildet werden:

Abbildung 3

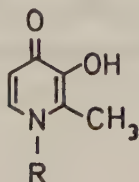


Dieses Schema zeigt auch, dass es zur Bildung zweier verschiedener γ -Pyrone kommen kann. Ist nämlich am C⁴ der Zuckerkette kein anderer Zucker glycosidisch gebunden, bildet sich nicht Maltol 5, sondern die günstigere Wasser-

abspaltung führt zum 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy- γ -Pyrone 7. 7 kann leicht zum Dihydroxy- γ -Pyrone 6 oxidiert werden. Diese Reaktion ist bereits bei längerer Lagerung zu beobachten.

Wie Severin und Seilmeier zeigen konnten (34), wird das Dihydropyron bevorzugt aus Monosacchariden gebildet, während Maltol ein typisches Disaccharidprodukt ist. Da die Protonen am C⁶ nicht acidifiziert sind, kann auch keine Wasserabspaltung von 7 zu 5 stattfinden. Dass dennoch auch in Karamellisierungsansätzen von Monosacchariden in manchen Fällen Maltol nachgewiesen werden kann (35), ist vermutlich auf Reversion, d.h. die Oligomerisation von Zuckern unter Hitze- bzw. Säureeinfluss zurückzuführen (36-38). Die dabei u.a. entstehenden 1,4-glycosidisch verknüpften Di- bzw. Oligosaccharide können ganz im Sinne von Abbildung 3 zu Maltol reagieren.

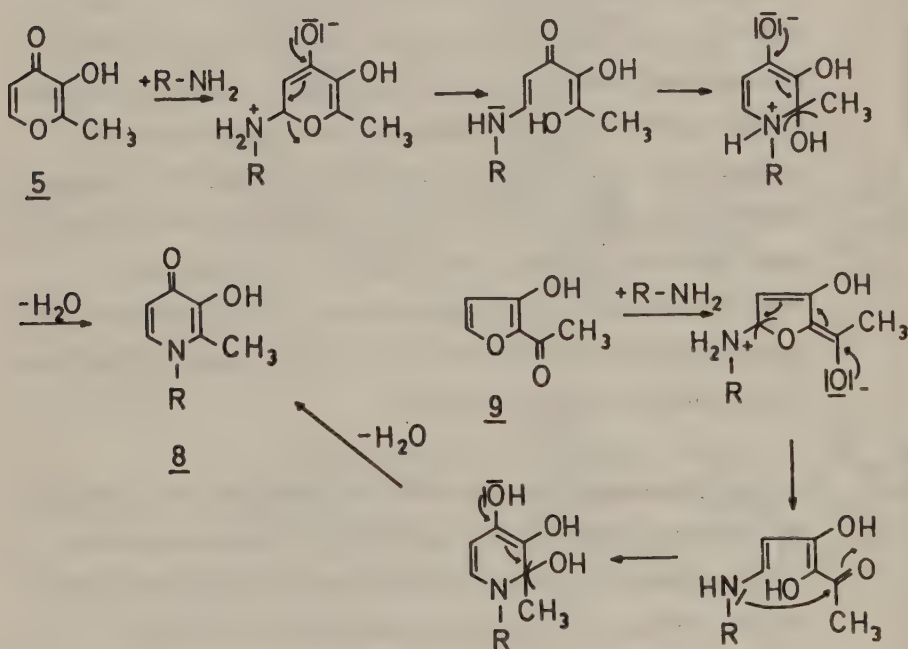
Es ist lange bekannt, dass bei der Umsetzung von γ -Pyrone mit primären Aminen bzw. Ammoniak γ -Pyridone entstehen (39-41). Severin und Loidl isolierten 1976 als erste dem Maltol analoge γ -Pyridone 8a und 8b aus Maillard-Reaktionsgemischen. (42).



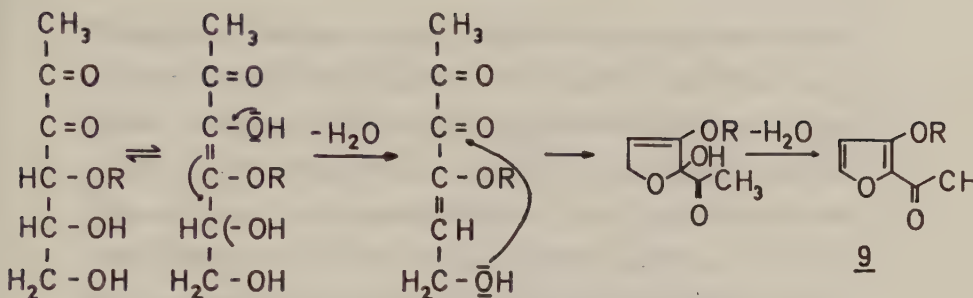
- 8 a. R = CH₃
 b. R = CH₂-COOH

Bislang ist noch nicht geklärt, ob die Pyridone 8 über offenkettige Vorstufen aus 3 gebildet werden, oder aber über Maltol 5 bzw. Isomaltol 9 entstehen (vergl. Abbildung 4). Sicher ist, dass die Pyridone aus Isomaltol in guter Ausbeute erhalten werden können.

Abbildung 4



Isomaltol 9 ist wie Maltol 5 ein charakteristisches Hauptprodukt des 1-Desoxyabbauweges der Disaccharide:



Dieses Furanderivat wurde ursprünglich aus mit Milch gebackenem Brot isoliert (43), in seiner Struktur jedoch erst viel später aufgeklärt (44).

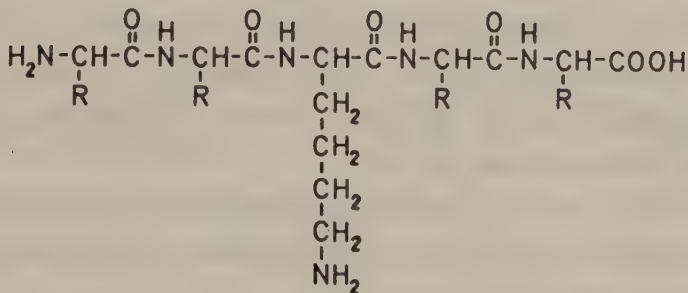
Wie Maltol werden auch die γ -Pyridone vornehmlich aus Disacchariden (Maltose und Lactose) gebildet. Bei entsprechenden Umsetzungen mit Aminen findet man in der Regel nur noch geringe Mengen Maltol.

Inwieweit auch aus dem Monosaccharidprodukt 6 entsprechende Dihydroxy- γ -pyridone entstehen können, wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

In Lebensmitteln treten Amine überwiegend in drei verschiedenen Formen auf:

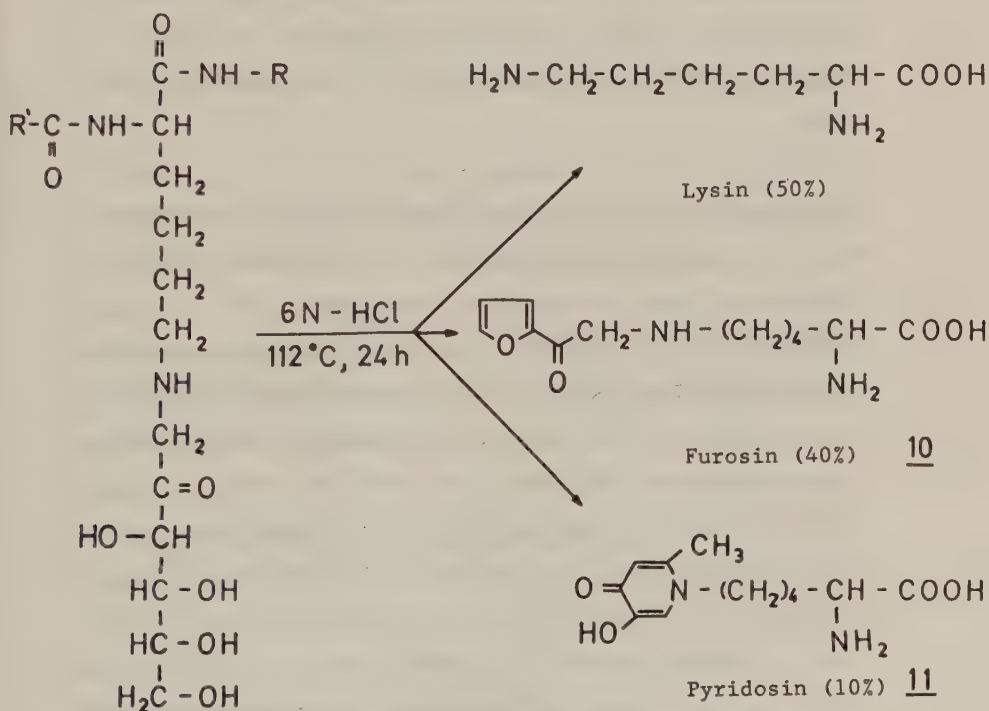
- als freie Amine (primär oder sekundär)
- als freie Aminosäuren (primär oder sekundär)
- als Aminosäuren im Protein/ Peptidverband

Die Konzentration an freien Aminen ist in der Regel gering, auch freie Aminosäuren werden in grösserem Umfang nur in speziellen Lebensmitteln und oft nur bei der Zubereitung freigesetzt. So ist der überwiegende Teil der reaktionsfähigen Amine im Peptidverband zusammengefasst. Da aber eine Säureamidbindung die Basizität der Amine so weit herabsetzt, dass der Stickstoff keine Reaktionen vom Maillard-Typ mehr eingehen kann, befinden sich reaktive Aminogruppen lediglich am N-terminalen Ende der Peptidkette, sowie vor allem am C⁶ der eiweissgebundenen Aminosäure Lysin:



Mit der Reaktion der freien ϵ -Aminogruppe des Lysins zu Amadoriprodukten (z.B. 1-Amino-1-Desoxyfructose) und weiteren Abbaureaktionen des Lysins geht eine zum Teil erhebliche Verschlechterung des Nährwertes von Lebensmitteln einher. So sind bereits zahlreiche Verfahren zur Quantifizierung dieser Eiweisschädigung erarbeitet worden (z.B. 45,46).

Eine der am häufigsten angewandten Methoden zur quantitativen Bestimmung des Amadoriprodukts der essentiellen Aminosäure ist die Untersuchung der Proteinhydrolysate mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie. Von besonderer Bedeutung sind dabei zwei Kunstprodukte, die bei der salzsauren Eiweißhydrolyse aus peptidgebundenem ϵ -N-(1-Desoxyfructosyl)-L-Lysin (Amadoriprodukt) entstehen (47-51).

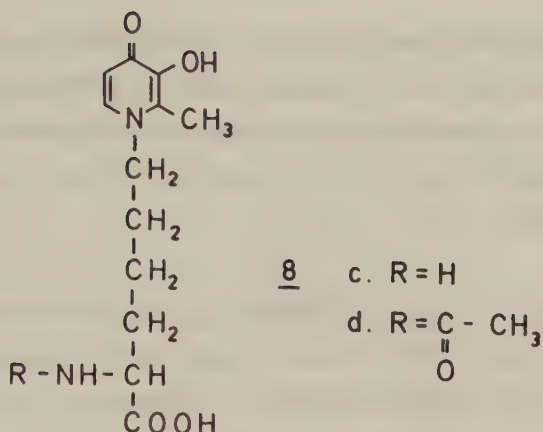


ϵ -N-(1-Desoxyfructosyl)-L-Lysin

(Nach Belitz/Grosch (52))

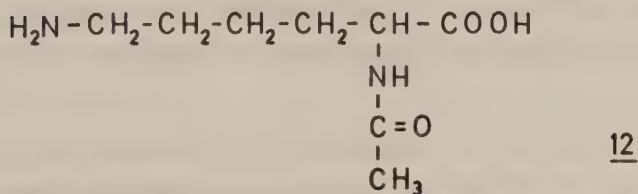
Diese Kunstprodukte Furosin 10 (ϵ -N-(2-Furoylmethyl-L-Lysin) sowie Pyridosin 11 (ϵ -N-(1,4-Dihydro-3-hydroxy-6-methyl-4-oxo-1-pyridyl)L-Lysin) werden am Aminosäureanalysator unter Standardbedingungen gut von den Aminosäuren abgetrennt und können damit quantitativ bestimmt werden. Da beide Verbindungen ausserdem in einem definierten Verhältnis zueinander aus dem Amadoriprodukt entstehen, ist eine quantitative Bestimmung der Eiweisschädigung auf diesem Wege möglich. Auch auf medizinischem Gebiet wird diese Methode zur Bestimmung glycosylierten Eiweisses angewandt (53).

In neuerer Zeit mehren sich Befunde, dass das Verhältnis Pyridosin zu Furosin bei der Untersuchung von Lebensmitteln nicht immer konstant ist. Dabei tritt eine, je nach Lebensmittel bzw. Lagerdauer mehr oder weniger ausgeprägte, stärkere Pyridosinbildung auf (46). Von manchen Autoren wird dies mit der Bildung von Pyridosin im Verlauf der Maillard-Reaktion begründet (53). Nach den oben dargelegten Ergebnissen im Hinblick auf eine Pyridonbildung bei Maillard-Reaktionen erschien es nun interessant, ob diese Befunde nicht eventuell auf eine Bildung des, dem Pyridosin 11 isomeren Pyridons 8c zurückzuführen sind. In diesem Fall wäre die primäre ϵ -Aminogruppe der Lysinseitenkette eine Reaktion im Sinne der Pyridonbildung, wie sie von Severin und Loidl gezeigt werden konnte (42), eingegangen.



Um hierüber Untersuchungen anstellen zu können, synthetisierte ich das Pyridon 8d. Dies gelang in guter Ausbeute aus einer Umsetzung von Isomaltol 9 mit N^α-Acetyllysin 12.

N^α-Acetyllysin 12 wählte ich für meine Untersuchungen als einfaches Eiweissmodell:



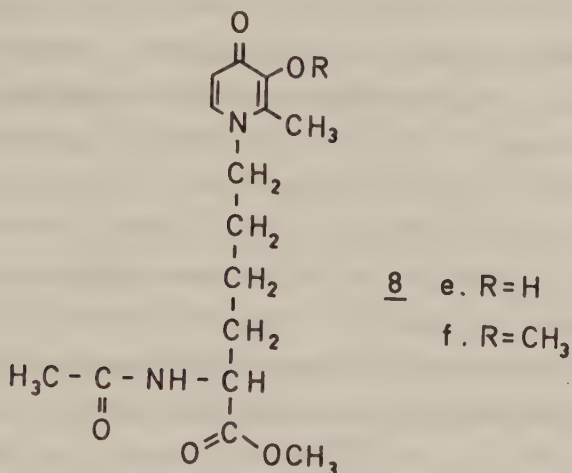
Wie im Peptidverband ist auch hier die α -Aminogruppe des Lysins als Säureamid blockiert, während das freie primäre Amin am Ende der Seitenkette Reaktionen eingehen kann. Die Herstellung von 12 erfolgte leicht modifiziert nach Literaturangaben (53-55).

Mit Hilfe der Vergleichssubstanz 8d war das Pyridon nun auch in Disaccharid/ N^α-Acetyllysin Reaktionsmischungen dünnschichtchromatographisch gut nachweisbar. Die Verbindung entsteht bevorzugt in neutraler, alkoholisch-wässriger Lösung. Da das Pyridon aufgrund seiner Polarität aus wässrigen Bräunungsansätzen nicht extrahiert werden kann, ist die Isolierung aus entsprechenden Substanzgemischen recht aufwendig.

So wurde 8d aus Umsetzungsgemischen von Maltose mit N^α-Acetyllysin, nach Ausfällung des Phosphatpuffers (pH 7) durch Alkoholzugabe, über eine Kieselgelsäule und anschliessend mit Hilfe der Niederdrucksäulenchromatographie abgetrennt. Bedingt durch Adsorption und Schlierenbildung lag die Ausbeute bei diesen Umsetzungen nur bei etwa 0,5%.

Um die Polarität der Verbindung zu erniedrigen und dadurch z.B. eine Extraktion des Pyridons aus Mischungen zu ermöglichen, versuchte ich verschiedene Derivatisierungsmethoden. Den Methylester 8e erhielt ich durch Kochen von 8d in

methanolischer Salzsäure. 8e ist nur bei sehr hohen Temperaturen ($> 200^{\circ}\text{C}$) im Hochvakuum destillierbar und konnte gaschromatographisch nicht erfasst werden.



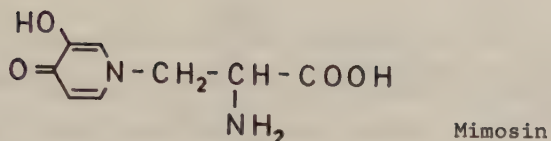
Die Bismethylierung der Verbindung 8d zu 8f wurde mit Dimethylsulfat wie auch mit Diazomethan versucht. Beide Verfahren führten zur Isolierung eines Produktes mit der Molekularmasse 314. Obwohl dies eine Bismethylierung von 8d indiziert, ist aufgrund des NMR-Spektrums eine Alkylierung der enolischen Gruppierung zu 8f unwahrscheinlich (vgl. exp. Teil).

Besonders interessant war nun natürlich das Verhalten des Pyridons 8c am Aminosäureanalysator.

Als Vergleichssubstanz dazu wurde Pyridosin 11 durch eine Umsetzung von Allomaltol mit N^α-Acetyllysin synthetisiert. Tatsächlich stellte ich fest, dass die Verbindung 8c unter Standardbedingungen (s.exp.Teil) mit der selben Retentionszeit eluiert wird, wie das isomere Pyridosin. Damit wäre also ein gegen Furosin vergleichsweise überhöhter Pyridosingehalt bei lange erhitzten bzw. gelagerten Lebensmitteln (46, 53) eventuell auf die Bildung des Pyridons 8c zurückzuführen, das wir um seine Verwandtschaft zum Maltol auszudrücken als Maltosin bezeichnet haben. Von Interesse ist dabei vor allem, dass Maltosin bereits im Lebensmittel vorliegt, während Pyridosin als Kunstprodukt erst bei der salzsauren Eiweißshydrolyse gebildet wird (s.o.).

Die Bedeutung des Maltosins in Lebensmitteln aufzuzeigen, wird sicher Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Dabei sollte sich zeigen, ob sich Maltosin und Pyridosin eventuell gaschromatographisch trennen lassen (56), oder ob die Hochdruckflüssigkeitschromatographie die Methode der Wahl zum Nachweis der beiden isomeren Pyridone sein wird.

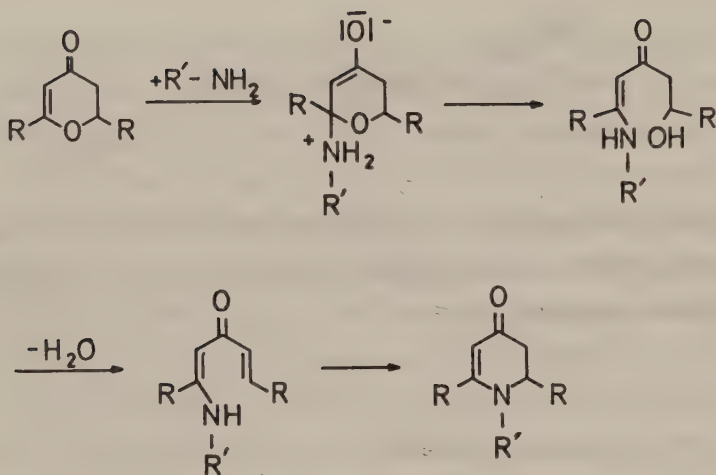
Ein strukturell ähnliches Pyridon, das Mimosin, wurde vor einigen Jahren als Naturprodukt aus Leguminosenarten isoliert. Interessant ist dabei die hohe Toxizität der Ver-



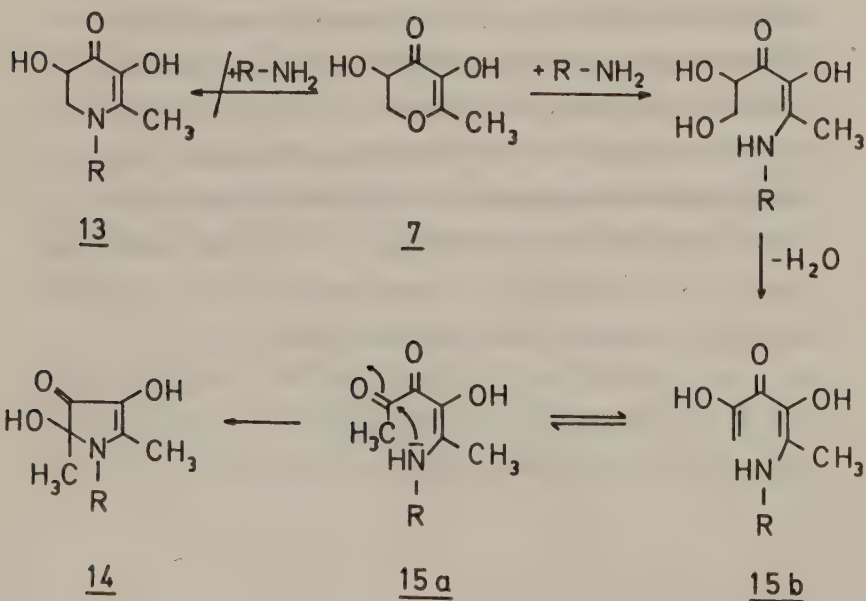
bindung. So wurden z.B. bei Ratten und Schweinen neben allgemeiner Entkräftung auch Unfruchtbarkeit und teratogene Effekte beobachtet (57).

2.2. 2,3-Dihydro- γ -Pyrone

Wie bereits dargelegt handelt es sich bei den γ -Pyronen und γ -Pyridonen vom Maltol-Typ um typische Disaccharidprodukte, während aus Monosacchariden als Hauptprodukt des 1-Desoxyabbauweges das 2,3-Dihydropyranon 7 gebildet wird. Aufgrund der fehlenden zweiten Doppelbindung ist der N/O-Austausch bei diesen Strukturen weniger begünstigt. Nach den Ergebnissen von Eskenazi und Mitarbeitern (58) sollten aber doch bei der Umsetzung mit primären Aminen Dihydropyridone entstehen. So stellten sie aus 6-Alkyl- und 2,6-Bisalkyl-2,3-dihydro- γ -pyronen die entsprechenden zum Teil N-alkylierten 2,3-Dihydropyridone dar. Sie schlugen dabei folgenden Reaktionsmechanismus vor:

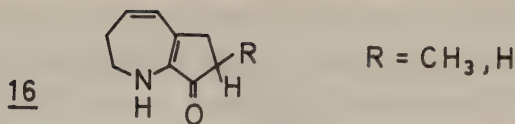


Versuche, das entsprechende Dihydro- γ -pyron 13 aus 7 herzustellen, schlugen aber bislang fehl. Die Ursache dafür ist vermutlich die OH-Gruppe an Position 3.



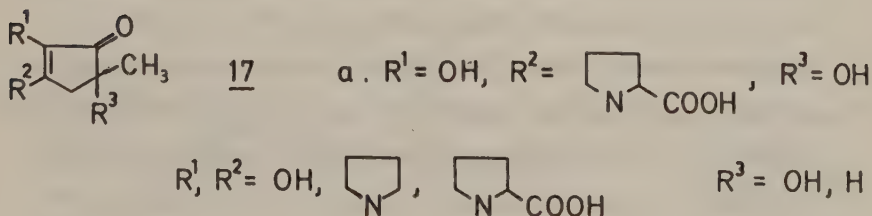
Selbst wenn analog eine Wasserabspaltung zum Aminoreduktion 15b stattfindet, wird dieses sicher in die Form 15a übergehen. Aus solchen Zwischenprodukten könnte es dann durch Cyclisierung zu Verbindungen vom Typ 14 kommen. Auf Strukturen dieser Art werde ich später noch weiter eingehen.

Weniger von mechanistischem als vielmehr von lebensmittel-technologischem Interesse ist die Umsetzung des Dihydro- γ -pyrcons 7 mit sekundären Aminen, wie z.B. der sekundären Aminosäure Prolin. Diese Aminosäure kommt, wie allgemein sekundäre Amine, in Lebensmitteln in der Regel nur in geringen Anteilen vor. In Malz und Bier ist der Gehalt an freiem Prolin aber vergleichsweise hoch (59). Auch weiss man, dass beim Erhitzen von Prolin mit Carbonylverbindungen brot- bzw. crackerähnliche Aromen entstehen (60, 61). Besonders intensiv wurde die Bildung von Aromastoffen bei Umsetzungen von Zuckern mit Prolin bzw. Hydroxyprolin von Tressl u. Mitarb. untersucht (62). Neben zahlreichen aromatischen Pyrrolen, Pyridinen und dem in grosser Menge entstehenden tricyclischen Malzoxazin (63) konnten sie kürzlich auch Bitterstoffe in Malz und Bier identifizieren. Es handelt sich dabei um Cyclopent[b]azepinderivate des Typs 16 (64).



Strukturen dieser Art werden unter anderem für den Bittergeschmack von Bieren, die unter Anwendung der Hochtemperatur-Würzekochung hergestellt wurden, verantwortlich gemacht (65).

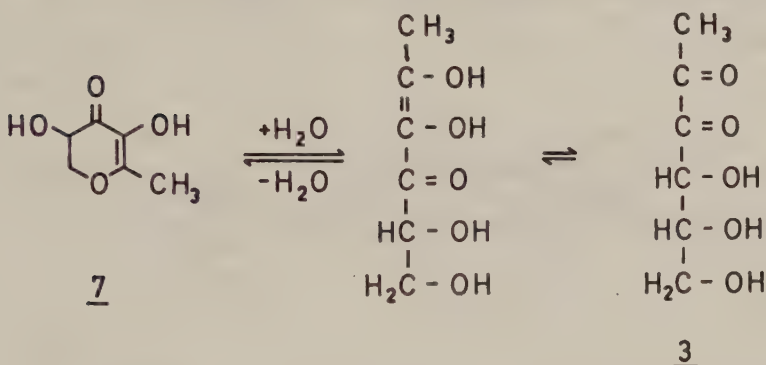
Unabhängig davon untersuchte Papst den Bittergeschmack von Prolin / Saccharose Röstansätzen (66). Aus solchen Umsetzungen konnte er zahlreiche bittere Amino- und auch Diaminohexosereduktone des Typs 17 isolieren (67).



Um die Strukturen der isolierten Verbindungen aufzuklären, wurde von Ledl (68) auch das Dihydro- γ -pyron 1 mit Prolin umgesetzt.

Aufgrund bekannter Folgereaktionen kann man annehmen, dass 1 in wässriger Lösung im Gleichgewicht zu offenkettigen

Formen der 1-Desoxyhexodiulose 3 steht. Daher ist 7 ein guter Ersatz für den synthetisch noch nicht in grösserem Umfang darstellbaren 1-Desoxyzucker 3 (69).

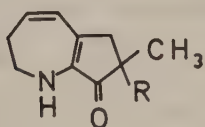


So gelang es über eine Umsetzung des Dihydropyranons 7 mit Prolin erstmals, das Aminohexoseredukton einer sekundären Aminosäure 17a zu erhalten. Auf diese Verbindung, die ich auch über eine 1,6-Didesoxyverbindung erhielt, werde ich später noch genauer eingehen.

2.3. Cyclopent[b]azepinderivate

Bei der Umsetzung von 7 mit Prolin entstehen neben dem Aminohexoseredukton auch zwei Cyclopent[b]azepinderivate 16a und 16b, die ich aus entsprechenden Ansätzen isolierte. Während 16a bisher unbekannt war, wurde

16b bereits von Tressl u. Mitarb. aus Malz und Bier isoliert (s.o.). Wie Pabst (69) zeigte, weisen beide Verbindungen einen ausgeprägten Bittergeschmack auf. Der Schwellenwert der Verbindung 16b ist noch deutlich niedriger als der von 16a.



16

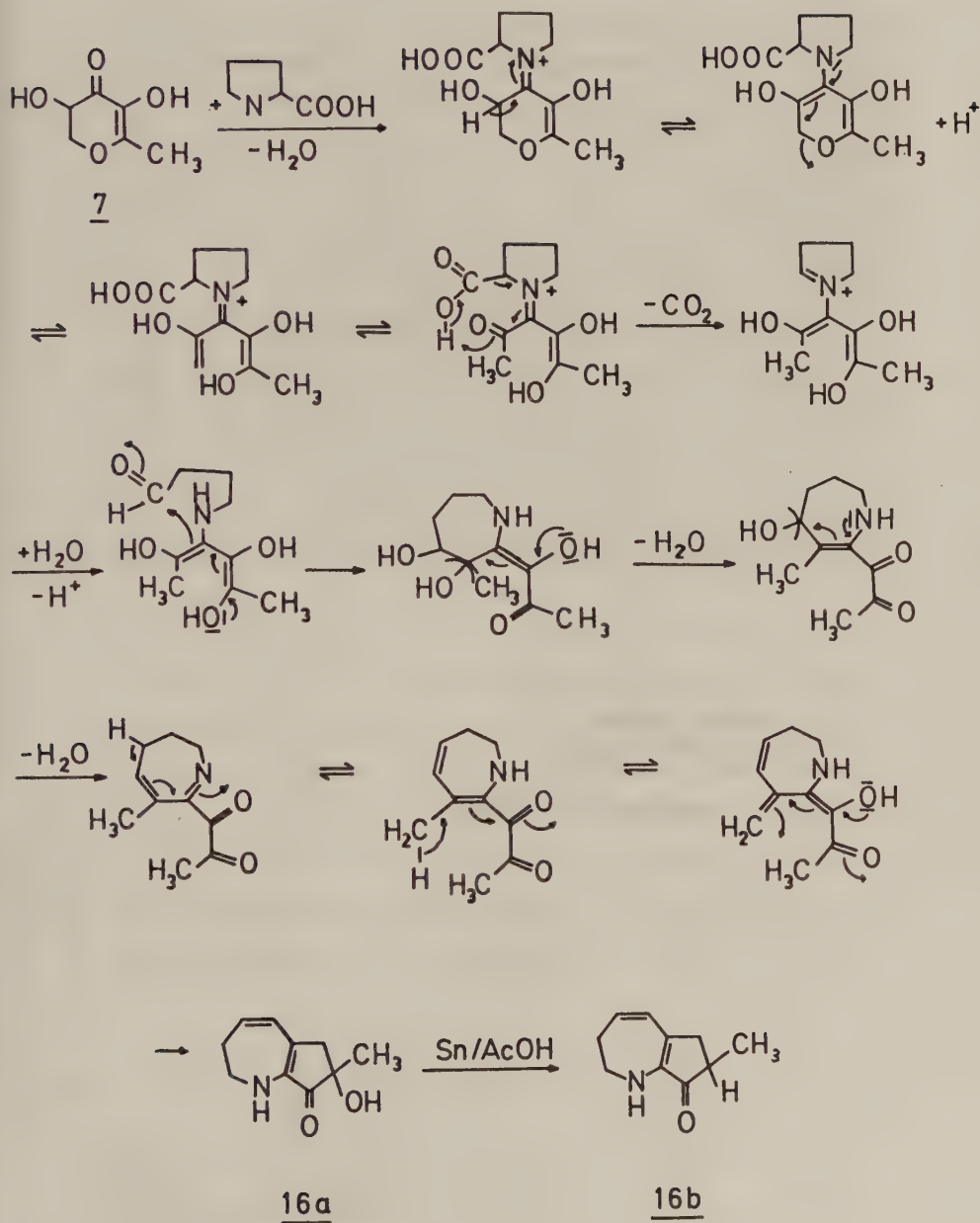
a. R = OH

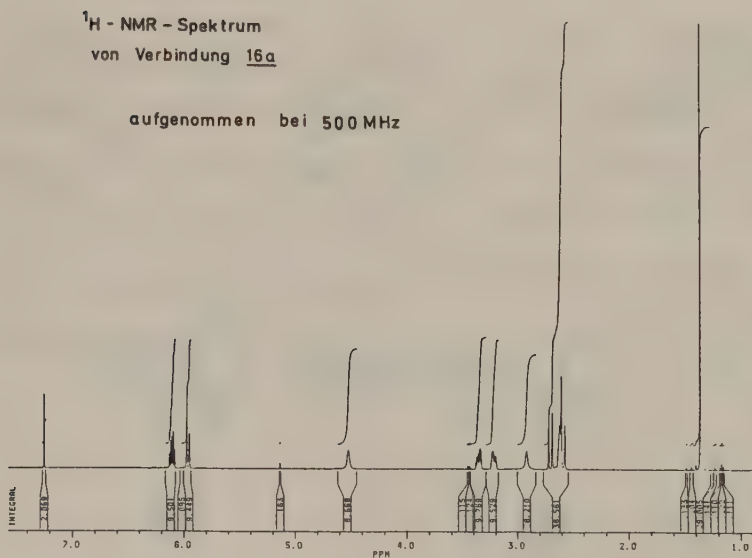
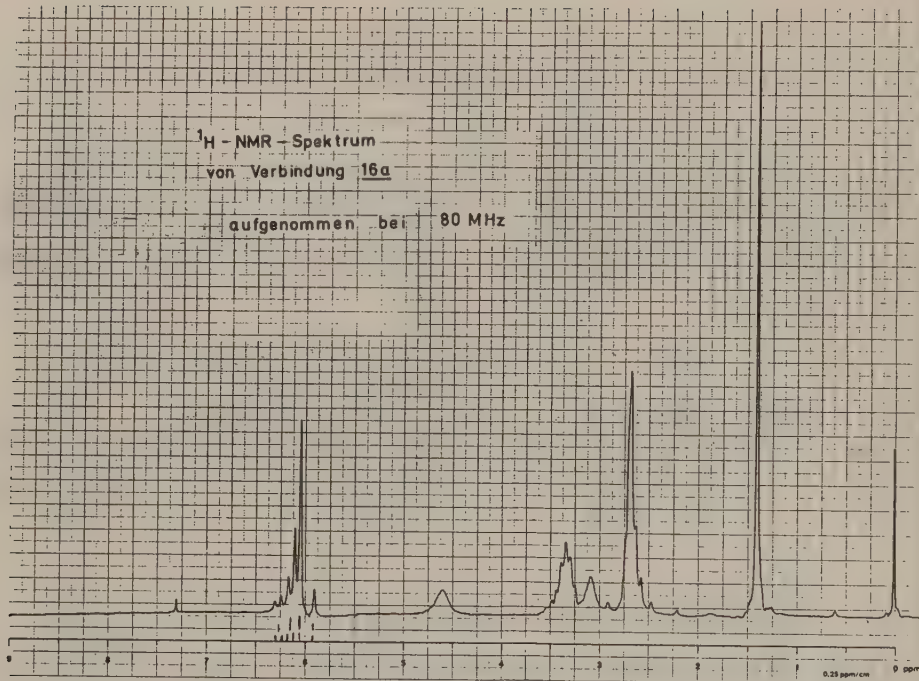
b. R = H

Nach meinen Untersuchungen ist 16b vermutlich über 16a entstanden. Die Bildung des Cyclopent [b]azepinderivates 16a aus 7 kann mit dem in Abb. 5 dargestellten Reaktionsmechanismus erklärt werden.

16a kann durch Reduktion unter Wasserabspaltung leicht in 16b übergehen. Dies ist bei Maillard-Umsetzungen nichts Ungewöhnliches, da im Verlauf der Reaktion zahlreiche reduzierende Verbindungen entstehen. Auch konnte ich 16a durch Reduktion mit Zinn in Eisessig nahezu quantitativ in 16b überführen. Die Reduktion wurde dabei gaschromatographisch verfolgt. Die UV-Spektren beider Verbindungen sind nahezu gleich.

Abbildung 5





800 MHz
LERCHEM.001
DATE 5-3-85
SP 500.135
ST 83.359
G1 7398.005
SI 32768
TO 32768
SR 4484.286
HZ/PT 272
PV 2.0
RD 1.000
RO 3.67
RG 40
HS 56
TE 300
FV 5600
DZ 0.0
DP 10L PG
LB -10C
GB 20C
CS 30.0C
CT 18.0C
F1 7.56
F2 8.72
HZ/CN 111.60
PPM/CN 22.3
SR 5426.10

Die Schwierigkeiten, die mit der Strukturaufklärung solcher Substanzen verbunden sein können, sollen hier anhand des NMR-Spektrums der Verbindung 16a veranschaulicht werden.

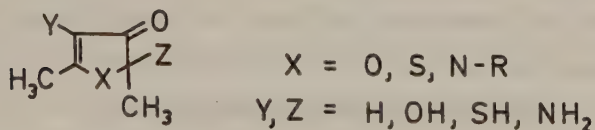
Durch die schlechte Auflösung des 80 Mhz-Spektrums ist eine sichere Zuordnung der Signale kaum möglich. Erst mit Hilfe eines bei 500 MHz aufgenommenen Spektrums gelang es, die Spektraldaten von 16a richtig zu interpretieren und die entsprechende Struktur zuzuordnen. Zur ausführlichen Diskussion der Spektren sei auf die Literatur verwiesen (66).

Interessant ist, dass bei der Umsetzung von 7 mit Prolin in Wasser auch nach 90 h am Rückfluss kaum Reaktion eintritt. Als einziges in grösserem Umfang gebildetes Folgeprodukt konnte ich aus entsprechenden Ansätzen das Oxidationsprodukt 6 isolieren. Nur bei Umsetzung in Ethanol (über Nacht am Rückfluss) erhielt ich neben 6 die Verbindungen 16a und 16b als Hauptprodukte. Die Auftrennung und Reinigung der Substanzen erfolgte nach stufenweiser flüssig/flüssig-Extraktion mit Methylenchlorid und Essigsäure-ethylester dünnschichtchromatographisch (vgl.exp.Teil).

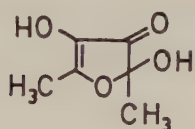
2.4. Acetylformoin und verwandte Aromastoffe

Die Bildung von Aromastoffen ist trotz allen anderen Forschungstendenzen wohl immer noch einer der wichtigsten Aspekte der Maillard-Reaktion. Der Duft von gebratenem Fleisch, von frischem Brot oder auch von geröstetem Kaffee ist international und zeigt die Bedeutung dieser Reaktion für unsere Lebensqualität. Auch wenn man inzwischen weiss, dass das charakteristische Aroma eines Lebensmittels meist nicht durch einige wenige, sondern oft durch mehrere hundert Substanzen gebildet wird, ist man heute doch schon in der Lage, bestimmte Aromaeindrücke auch synthetisch herzustellen. Eine grosse Rolle spielen dabei vor allem Heterocyclen, die im Verlauf der Maillard-Reaktion gebildet werden. Ihre Vielfalt ist in letzter Zeit in einigen Übersichtsartikeln anschaulich dargelegt worden (3-7).

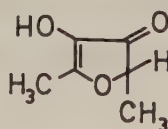
Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte ich speziell Verbindungen des allgemeinen Typs 19.



Strukturen dieser Art sind in hohem Masse aromagebend und besitzen im Falle der Sauerstoffverbindungen fruchtig/karamellartige Geruchsnoten (vgl. 3, S.198f). Von besonderer Bedeutung sind dabei zwei Substanzen 20 und 21, die bereits mehrfach in Lebensmitteln und Modellumsetzungen nachgewiesen wurden.



20



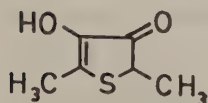
21

Das Acetylformoin 20 ist eine wichtige Zwischenstufe des 1-Desoxyabbauweges, die auch in geringsten Konzentrationen einen intensiven Aromaeindruck von fruchtig/erdbeerartigem Karamel hinterlässt. Das durch Reduktion von 20 oder z.B. aus Rhamnose in grosser Menge entstehende Furaneol 21 stellt neben dem Maltol 5 eine der wichtigsten industriell genutzten Aromakomponenten der Richtung süss, fruchtig, karamellartig dar. So wird Furaneol heute bereits im Tonnenmassstab produziert und von der Aromenindustrie als "naturidentisches Aroma" verwendet.

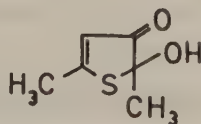
Ersetzt man nun ein oder mehrere Sauerstoffatome durch Schwefel, entstehen intensiv riechende Verbindungen, deren

Aromante von gebratenem Fleisch bis zu Röstzwiebeln reichen kann. Die Bedeutung für die Industrie ist aus mehreren Patenten ersichtlich, von denen sich eines ganz speziell mit schwefelanalogen Verbindungen des Furaneols 21 befasst (71).

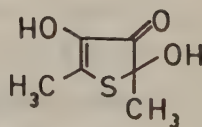
Kürzlich berichteten Shu und Mitarb. (72) über eine Umsetzung von Furaneol mit Cystin. Sie erhielten dabei als Hauptprodukte die flüchtigen 2,3-Dihydrothiophenone 22, 23 und 24.



22



23



24

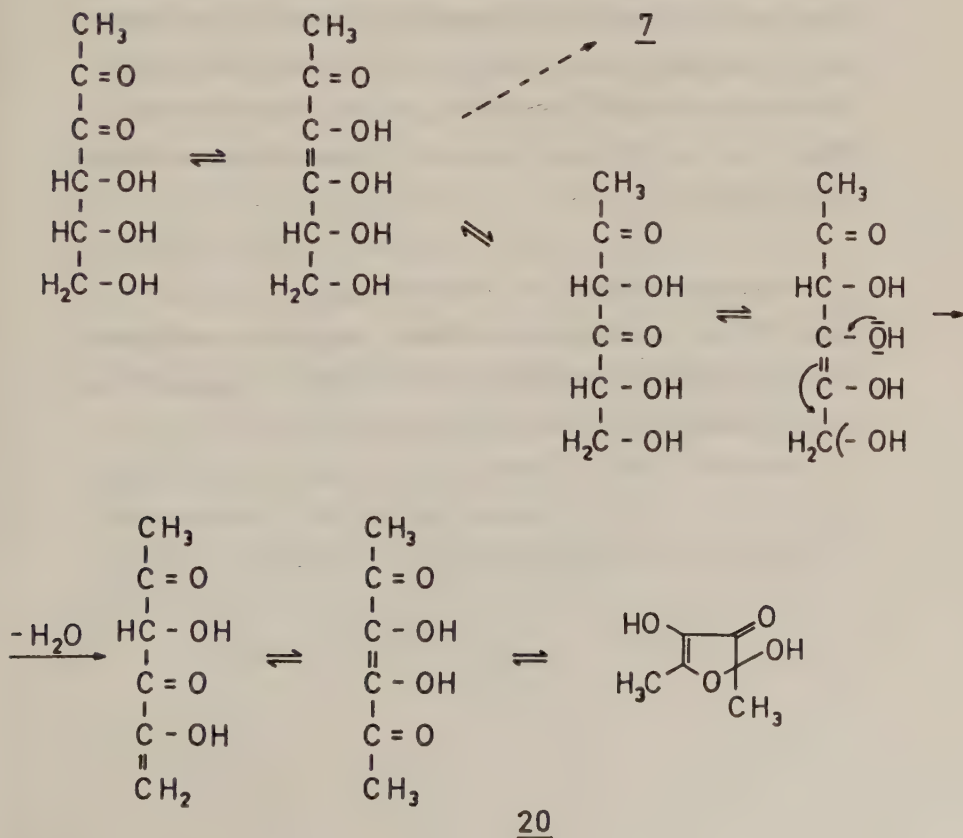
Aufgrund ihrer Forschungsergebnisse postulierten sie, dass 23 und 24 während der Lagerung aus 22 entstünden. Die Verbindung 22 wurde bereits 1969 (71) als aromatische Substanz beschrieben.

Ich untersuchte nun, ob sich die Verbindung 24 nicht auch durch Reaktion von Acetylformoin 20 mit schwefelhaltigen Aminosäuren darstellen lässt. Wie das folgende Reaktionsschema (Abb. 6) zeigt, ist Acetylformoin neben dem

Dihydro- γ -pyron 7 eines der wichtigsten bekannten Zwischenprodukte des 1-Desoxyabbauweges.

Wie aus der offenkettigen Form gut zu ersehen ist, entspricht das Acetylformoin einer 1,6-Didesoxyhexosulose. Da auch bekannt ist, dass Cystein, Cystin und andere schwefelhaltige Aminosäuren zur Bildung von Fleischaromen beitragen (z.B.: 4), sollten schwefelhaltige Verbindungen wie 22 und vor allem 24 in solchen Lebensmitteln als Aromastoffe enthalten sein.

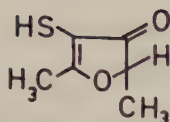
Abbildung 6



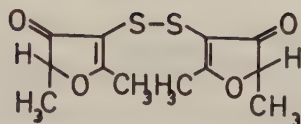
Um entsprechende Verbindungen zu erhalten, setzte ich Acetylformoin 20 mit verschiedenen schwefelhaltigen Substanzen um. Die Reaktion mit Natriumsulfid bzw. Lawessons-Reagenz (2,4-bis(4-methoxyphenyl)-1,3-dithia-2,4-diphosphetan-2,4-disulfid) bei erhöhter Temperatur führte zu unübersichtlichen Substanzgemischen. Mit Phosphorpentasulfid P_2S_5 in Methylenchlorid hingegen konnte ich mit Hilfe von Ultraschall zur intensiven Durchmischung und unter Rückfluss das Thiophenon 22 in guter Ausbeute erhalten.

Die Untersuchung der Reaktionsmischungen erfolgte in der Regel gaschromatographisch nach Destillation am Hochvakuum mit an den Gaschromatographen angekoppeltem Massenspektrometer. Die Abtrennung und Reinigung von Hauptprodukten führte ich mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie durch.

In Umsetzungsgemischen von Furaneol 21 mit Lawesson's-Reagenz (73) in Methylenchlorid konnte das 4-Mercapto-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon 25 neben verhältnismässig grossen Mengen des Disulfids 26 identifiziert werden.



25

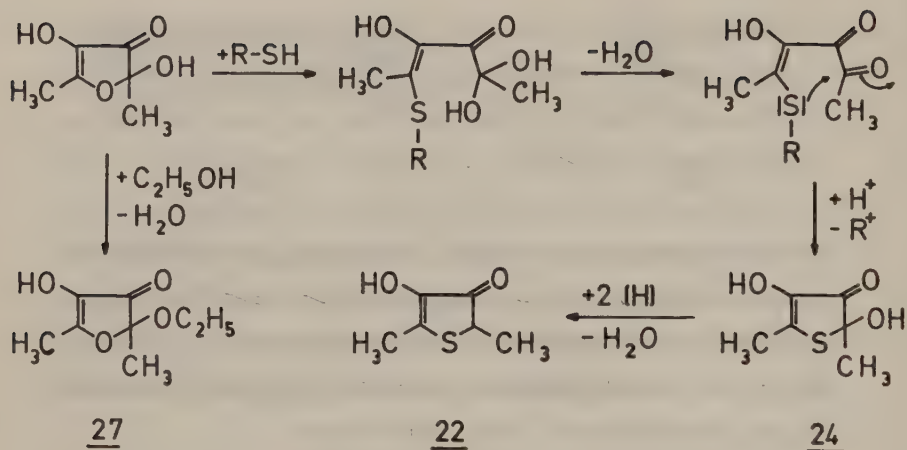


26

Die isolierte und gereinigte Verbindung 26 ist völlig geruchlos, während die reduzierte Form 25 einen äusserst intensiven, nur in starker Verdünnung angenehmen röstzwiebelartigen Geruch aufweist. Beide Verbindungen sind bisher in der Literatur noch nicht beschrieben.

Es gelang mir schliesslich, die Verbindung 24 durch eine Umsetzung von Acetylformoin 20 mit Cystin und Cystein im Autoklaven (140°C, 1h) zu erhalten. Als Lösungsmittel empfiehlt sich reines Wasser, da in ethanolischen Lösungen ein verhältnismässig grosser Teil des Acetylformoins als Ethylacetal 27 der Reaktion entzogen wird.

Verwendet man bei der Reaktion nur Cystein als "schwefelndes Reagenz", findet in grossem Umfang Reduktion zur Verbindung 22 statt. So konnte ich z.B. in einer Reaktionsmischung der 1-Desoxy-1-piperidino-fructose (Piperidino-Amadoriprodukt) mit Cystein in Wasser (150°C, 3h) das reduzierte Thiophenon 22 über GC/MS-Kopplung nachweisen.



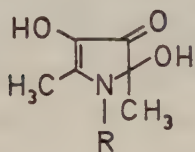
Durch die Verwendung eines relativ hohen Anteils an Cystin gelang es mir, die reduzierende Wirkung des Cysteins bzw. des aus ihm entstehenden Schwefelwasserstoffs (74) herabzusetzen und so die Substanz 24 zu isolieren. Im Gegensatz zu Shu u. Mitarb. (72), die die Verbindung 24 als Öl beschrieben, konnte ich das 2,5-Dimethyl-2,4-dihydroxy-3-(2H)-thiophenon in kristalliner Form erhalten. Die Substanz besitzt einen sehr angenehmen Geruch, der dem von gebratenem Speck und Zwiebeln nahekomm.

Mit Hilfe der von mir hergestellten Vergleichssubstanzen gelang es kürzlich Tressl u. Mitarb. in Berlin (75), die Verbindungen 24 und 25 erstmals auch in Reaktionsmischungen von Zuckern mit schwefelhaltigen Aminosäuren nachzuweisen.

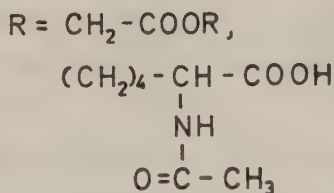
2.5. Pyrrolinonreduktone

Weitaus häufiger als Thiole kommen aber in Lebensmitteln primäre Amine vor. So ist es erstaunlich, dass entsprechende stickstoffhaltige Pyrrolinonreduktone als Produkte der Maillard-Reaktion bislang in der Literatur kaum beschrieben sind.

Die einzigen bisher bekannten Verbindungen dieses Typs erhielten Ledl und Fritsch (76) durch Umsetzungen von Acetylformoin 20 mit Aminosäuren. Die dabei entstehenden Pyrrolinonreduktone der allgemeinen Struktur 28 konnten sie indirekt auch in Lebensmitteln und Zucker/Amin Modellumsetzungen nachweisen.

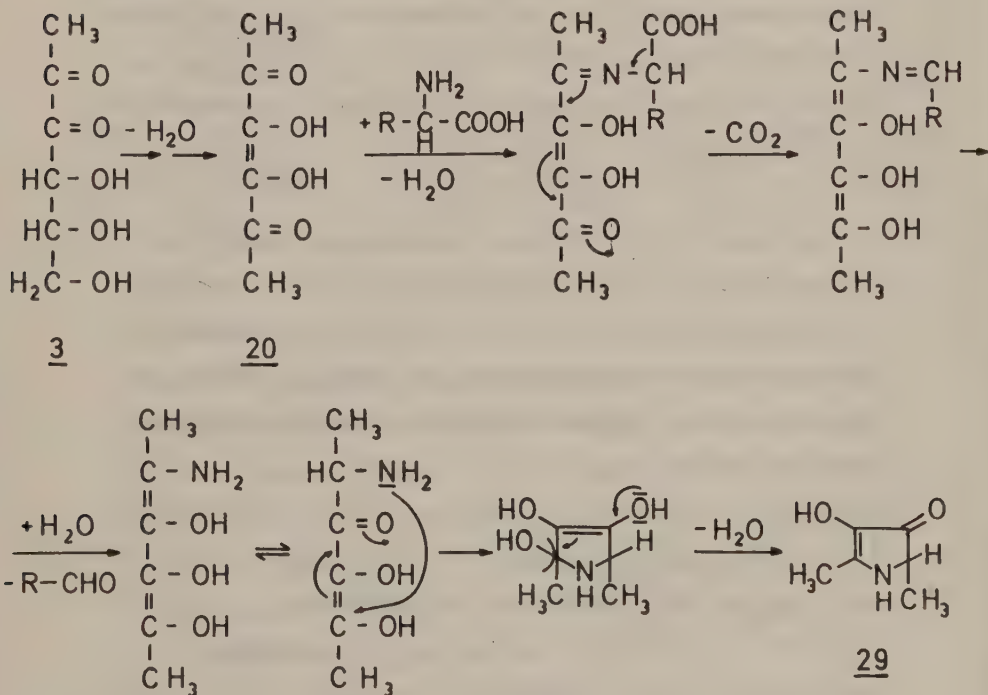


28



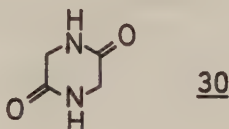
Aufbauend auf diese Arbeiten untersuchte ich, ob nicht das Pyrrolinonreduktion 29 -formal ein Reduktionsprodukt von 28- im Verlaufe der Maillard-Reaktion gebildet wird.

Diese Verbindung sollte ein wichtiges Produkt des 1-Desoxyabbauweges sein. Das ergibt sich aus folgender Überlegung:



Acetylformoin 20, das je nach Lösungsmittel mehr oder weniger in seiner offenkettigen Form vorliegt, reagiert dabei mit einer beliebigen freien, primären Aminosäure zum Imin. Im nachfolgenden Streckerabbau wird in das Acetylformoin reduktiv Stickstoff in Form von Ammoniak eingebaut. Das resultierende Molekül stabilisiert sich durch Cyclisierung unter Wasserabspaltung zum Pyrrolinonreduktion 29.

Um diese Verbindung zu erhalten, erhitzte ich Acetylformoin 20 mit Glycin. Zur ersten Anreicherung destillierte ich den Reaktionsansatz direkt am Hochvakuum. Dabei überwiegt in dem, ab 130°C/0.1 Torr destillierbaren, von Kristallen durchsetzten Öl, eine Substanz mit der Masse 127. Ab 180°C sublimiert das bekannte Diketopiperazin 30.



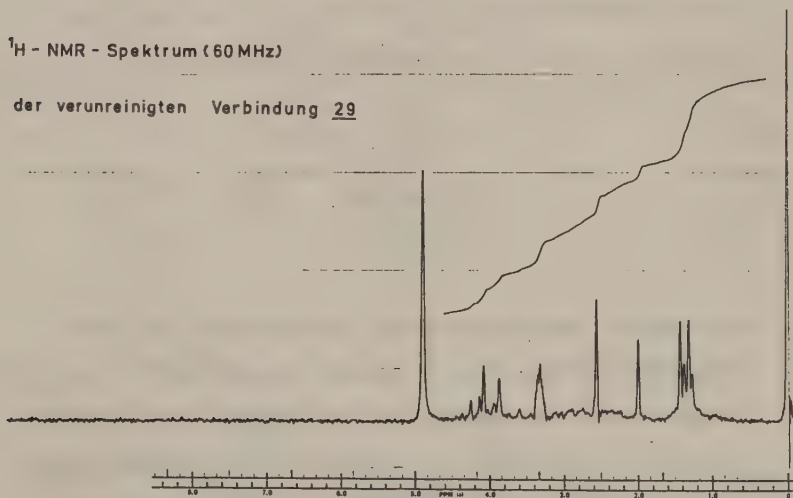
Wie mehrere Versuche zeigten, erweist sich die Dünnschichtchromatographie in diesem speziellen Fall zur Aufarbeitung als ungeeignet. Da aus keiner der zahlreichen Zonen ein Produkt mit der entsprechenden Molekularmasse erhalten wurde, kann man annehmen, dass die Verbindung durch das Kieselgel in bislang unbekannte Folgeprodukte umgewandelt wird, was eine Reinigung auf diesem Wege verhindert.

Trotz mehrerer Versuche gelang es bisher nicht, die Substanz 29 in reiner Form zu isolieren. Ich konnte lediglich Massenspektren mit der "richtigen" Masse 127 aufnehmen. Die für eine Bildung dieser Substanz optimalen Bedingungen sind dem experimentellen Teil zu entnehmen. Da sich auch die Säulenchromatographie als problematisch erwies und

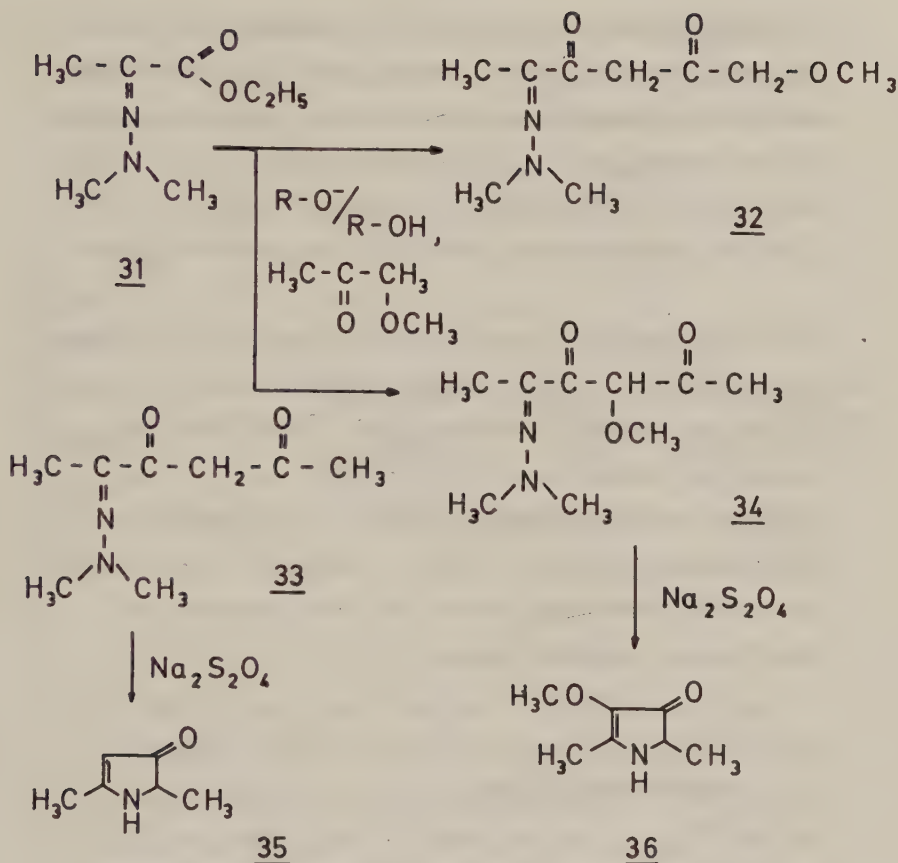
sich die Verbindung im Gaschromatographen zersetzte, fraktionierte ich destillativ, und konnte so NMR-Spektren der mehr oder weniger verunreinigten Verbindung aufnehmen.

^1H - NMR - Spektrum (60 MHz)

der verunreinigten Verbindung 29



Die Interpretation der Spektren bereitete grössere Schwierigkeiten als erwartet, so dass ich versuchte, die Verbindung 29 zu synthetisieren. Als Syntheseweg wählte ich das Verfahren nach Supp, der Ketone mit α -Hydrazonoestern zu Hydrazonodicarbonylverbindungen umsetzte und anschliessend zu 3-Pyrrolinonen cyclisierte (77). So sollte das Dimethylhydrazon des Brenztraubensäureethylesters 31, nach einer Kondensation mit Methoxyaceton zur Verbindung 34, reaktiv zum Pyrrolinon 36 cyclisiert werden.



Die Verbindung **36** sollte dann ebenfalls in einem mit Diazomethan behandelten Modellansatz gaschromatographisch mit MS-Kopplung nachweisbar sein. Da die Kondensation von Methoxyaceton mit dem Hydrazonoester **31** ein schwer trennbares Gemisch der 1- bzw. 3-Methoxyhydrazonodicarbonylverbindungen **32** und **34** ergab, wurde Aceton als Methylenkomponente eingesetzt. Der Versuch, das auf diese Weise gut

synthetisierbare Hydrazon 33 mit Natriumdithionit zum Pyrrolinon 35 zu cyclisieren, führte jedoch zu mehreren Folgeprodukten, deren Spektren sich nicht eindeutig interpretieren liessen. Ebenso konnte das Gemisch von 32 und 34 unter den von mir gewählten Bedingungen nicht in ein Gemisch der entsprechenden Pyrrolinone umgewandelt werden.

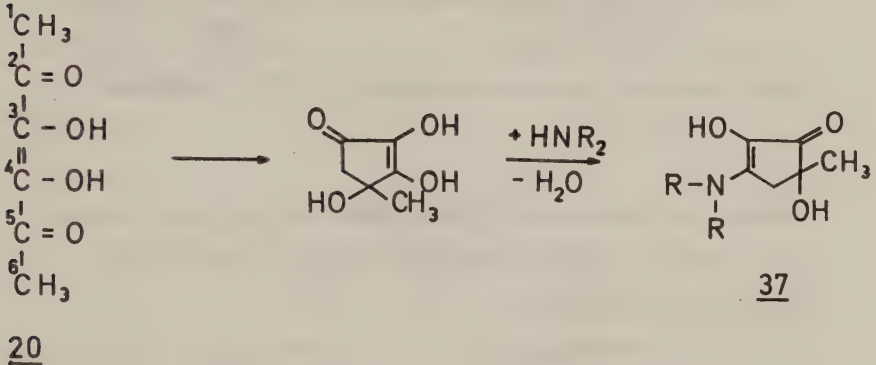
Welche Schlussfolgerungen aus diesen Ergebnissen zu ziehen sind, wird noch weitere Untersuchungen erfordern. Dabei sollte sich zeigen, ob Verbindungen dieses Pyrrolinontyps unerwartet reaktiv sind oder sich sonst leicht in noch unbekannte Produkte umwandeln können, ob das Nachweisverfahren anders zu wählen ist, oder ob solche Strukturen entgegen meinen Erwartungen doch nicht im Verlauf der Mailard-Reaktion gebildet werden.

2.6. Aminoexosereduktone .

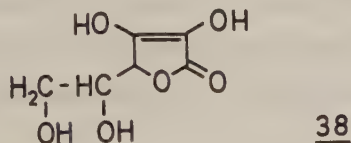
Es ist lange bekannt, dass bei der Reaktion von Zuckern mit sekundären Aminen carbocyclische Aminoreduktone des Typs 37 entstehen (78, 79).

Auf der Grundlage von Versuchen mit verschiedenen ^{14}C -markierten Zuckern konnte Simon bereits 1961 (80, 81) zeigen, dass die sogenannten "Aminoexosereduktone" 37 im Verlauf

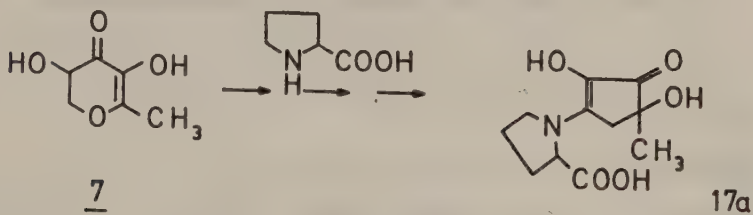
der Maillard-Reaktion über das Acetylformoin 20 gebildet werden. Der Ringschluss unter C-C Verknüpfung erfolgt dabei im Sinne einer Aldoladdition zwischen dem C² und C⁶ oder dem C¹ und C⁵ des offenkettigen Zuckerderivats.



Die antioxidativen Eigenschaften von Reduktonen tragen ganz entscheidend zum Erhalt des Aromas von z.B. frischem Bier, Kakao und anderen Lebensmitteln bei. Während diese positiven Eigenschaften der Ascorbinsäure 38, dem wohl bekanntesten Redukton, schon lange bei der Lebensmittelherstellung genutzt werden, ist über die industrielle Verwendung anderer Reduktone als Lebensmittelzusatzstoffe bislang nichts bekannt.



Wie bereits erwähnt, konnte kürzlich von Ledl (68) das Aminohexoseredukton 17a aus dem Dihydropyranon 7 hergestellt werden.



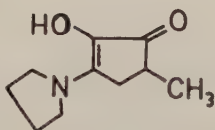
Nach allen bisherigen Erkenntnissen sollte diese Verbindung auch aus Acetylformoin 20 durch eine Umsetzung mit Prolin herstellbar sein.

Um dies zu untersuchen und um festzustellen, ob vielleicht auch Verbindungen vom Typ 16 über die 1,6-Didesoxyform der Zucker gebildet werden, setzte ich Acetylformoin mit Prolin unter verschiedenen Bedingungen um.

Tatsächlich beobachtete ich bei der Reaktion in Ethanol unter Rückfluss (ca. 90 min), dass beträchtliche Mengen von 17a gebildet werden. Während die mit Essigsäureethylester extrahierbare unpolare Fraktion uneinheitlich zusammengesetzt ist, stellt das "Prolinohexoseredukton" das Hauptprodukt der polaren, wässrigen Phase. Durch die intensive Blaufärbung mit Eisen(III)chlorid wird die Identifikation und vor allem die Isolierung der Verbindung mit

Hilfe der Dünnschichtchromatographie wesentlich erleichtert (s. exp. Teil).

Erhitzt man Acetylformoin mit Prolin in alkoholischer oder alkoholisch-wässriger Lösung im Autoklaven auf über 100°C (130-140°C, 120 min), so ist kein Prolinohexoseredukton 17a mehr nachweisbar. Stattdessen konnte ich das Pyrrolidinohexoseredukton 39 dünn-schichtchromatographisch identifizieren.



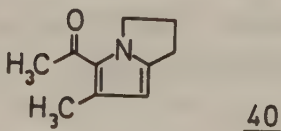
39

Die Untersuchung der unpolaren Phase ergab bei den autoklavierten Ansätzen ein deutlich anderes Bild als bei den weniger stark erhitzten. So konnte ich zwar das Cyclopent-[b] azepinderivat 16a bzw. 16b entgegen meinen Erwartungen in Acetylformoin/Prolin Ansätzen nicht nachweisen, die Untersuchungen ergaben jedoch, dass ein anderes Produkt mit der Masse 163 gebildet wird.

2.7. 2,3-Dihydro-1H-Pyrrolizine

Durch mehrere Umsetzungen, die destillativ am Hochvakuum sowie dünnschichtchromatographisch aufgearbeitet wurden, erhielt ich schliesslich die Verbindung in kristalliner Form. Die Substanz reagiert mit Dimethylaminobenzaldehyd im Sauren ("Ehrlich s Reagenz") zu einer tiefroten Verbindung. Sie kann daher nicht nur gas- sondern auch dünnschichtchromatographisch gut nachgewiesen werden (s. exp. Teil).

Eine Strukturaufklärung scheiterte an den geringen Substanzmengen sowie an den technischen Möglichkeiten. 1985 veröffentlichten Tressl und Mitarb. (82) zahlreiche Heterocyclen, die sie in Zucker/Prolin Modellumsetzungen nachwiesen. Daraus ergab sich, dass der unbekannten Verbindung mit der Masse 163 die folgende Struktur eines 2,3-Dihydro-1H-pyrrolizins 40 zuzuordnen war:

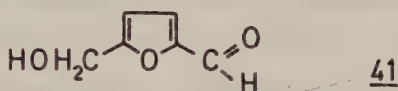


Unter dem Aspekt eines möglichen Bildungsmechanismus ist dabei vor allem interessant, dass die Verbindung 40 nur unter Bruch der Zuckerkette entstanden sein kann.

3. Untersuchungen zum 3-Desoxyabbauweg

3.1. Hydroxymethylfurfural und analoge Formylpyrrole

Wie das Maltol ist auch das Hydroxymethylfurfural (HMF) 41 ein seit über 90 Jahren bekanntes Zuckenumwandlungsprodukt. In seiner Struktur 1909 von Blanksma (83) aufgeklärt, war es bereits 14 Jahre zuvor von Kiermayer in München aus erhitzten Ansätzen von Zuckern mit Oxalsäure isoliert worden (84).



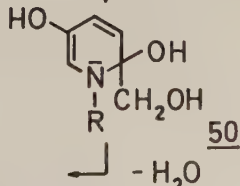
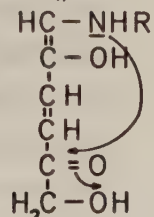
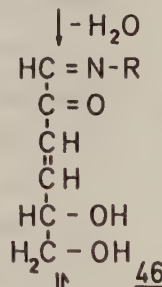
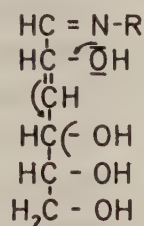
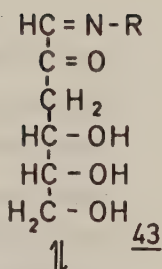
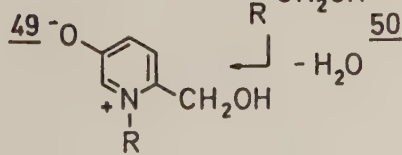
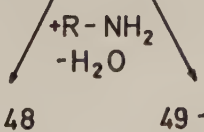
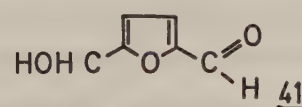
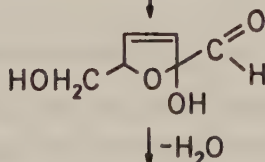
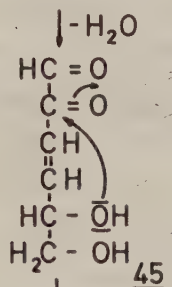
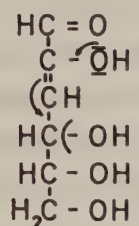
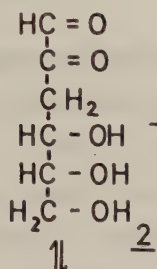
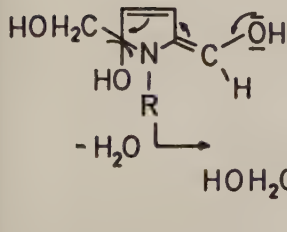
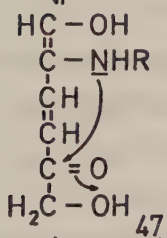
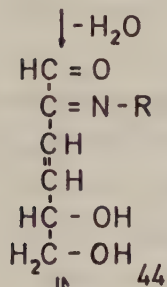
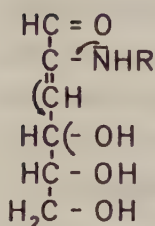
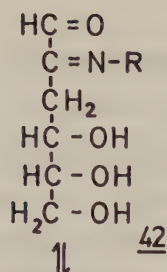
Hydroxymethylfurfural entsteht beim Erhitzen von Zuckern, wobei besonders im leicht sauren Medium beträchtliche Mengen gebildet werden können. Die leichte gaschromatographische Bestimmbarkeit der Verbindung, sowie die zahlreichen bekannten Farbreaktionen mit reaktiven Aromaten und C,H-aciden Verbindungen, haben dazu beigetragen, dass HMF schon lange als Indikatorsubstanz für Erhitzungsprozesse in Lebensmitteln, Arzneimitteln, wie z.B. auch für Mailard-Reaktionen in vivo gilt (16, 85-87). Auf die Problematik dieser Nachweise, die sich u.a. durch die leichte Bildung von HMF evtl. bereits bei der Aufarbeitung des

Probenmaterials ergibt, will ich hier nicht weiter eingehen. Von Interesse war vielmehr die Frage, ob und wie HMF mit primären bzw. sekundären Aminen zu evtl. noch unbekannten Verbindungen weiterreagieren kann und ob das Hydroxymethylfurfural eine gute Modells substanz für den 3-Desoxyabbauweg der Zucker darstellt.

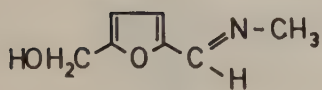
Im Gegensatz zum Maltol 5, das über den 1-Desoxyzucker 3 gebildet wird, entsteht HMF über den 3-Desoxyweg aus Zuckern. Die 3-Desoxy-D-erythro-hexos-2-ulose 2, die bereits mehrfach nachgewiesen und auch synthetisiert werden konnte (88-90), reagiert dabei über den hochreaktiven 3,4-Didesoxyzucker 45 unter Cyclisierung und Wasserabspaltung zum vergleichsweise stabilen Furankörper (vgl. Abb. 7).

Bei der Umsetzung von Zuckern unter Maillard-Bedingungen, d.h. zum Beispiel unter Zusatz von primären Aminen, erhält man anstelle des hohen Anteils an HMF eine entsprechende Menge des N-substituierten 5-Hydroxymethyl-2-formylpyrrols 48 (91). Primär hat dabei die C²-Carbonylgruppe der 3-Desoxyhexosulose 2 mit dem Amin zum Imin 42 reagiert. Unter mehrfacher Tautomerisierung und Wasserabspaltung kommt es über die 3,4-Didesoxyverbindung 44 zur Wanderung der Carboxylgruppe an das C⁵ der Zuckerkette 47. Die nachfolgende Cyclisierung und Wasserabspaltung liefert das N-substituierte Pyrrol 48.

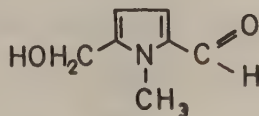
Abbildung 7



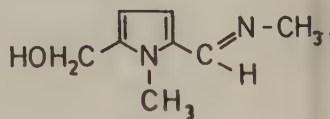
Da die Umsetzung von HMF mit Methylamin zum Formylpyrrol 52 nur unter drastischen Bedingungen gelingt, ist der Reaktionsverlauf über offenkettige Vorstufen bei der Bildung von 48 bzw. 52 aus Zuckern als wahrscheinlich anzunehmen. So konnten Jurch und Tatum (91) das 2-Formyl-5-hydroxymethyl-1-methylpyrrol 52 nur unter Autoklavierungsbedingungen aus HMF und Methylamin im Neutralen in 1,7% Ausbeute erhalten. Auch ich konnte aus dem Reaktionsgemisch einer Umsetzung von HMF mit Methylammoniumacetat (pH 7) unter Rückfluss (24 h) lediglich das Imin des Hydroxymethylfurals 51 isolieren.



51



52



53

Durch Erhitzen von HMF mit Methylammoniumacetat (10-20% wasserhaltig) in einer Schmelze ohne Lösungsmittel gelang es mir jedoch in etwas verbesserter Ausbeute (5-10%) das Imin des Formylpyrrols 53 zu erhalten (s.exp.Teil). Bei der dünnschichtchromatographischen Reinigung auf Kieselgel wird dieses zum Hydroxymethylformylpyrrol 52 hydrolysiert.

3.2. N-Alkyl-3-oxypyridiniumbetaine

3.2.1. Einleitung

Bei Betrachtung des in Abbildung 7 wiedergegebenen Reaktionsmechanismus stellt sich nun die Frage, ob nicht auf einem der Pyrrolbildung ähnlichen Weg 3-Oxypyridiniumbetaine der allgemeinen Struktur 49 entstehen können. Die Reaktion würde dabei folgenden Verlauf nehmen:

Primär kommt es am C^1 statt C^2 des 3-Desoxyzuckers 2 zur Iminbildung. Dieses Imin 43 reagiert nun ganz entsprechend unter Wasserabspaltung in die 3,4-Didesoxyverbindung 46, die nach Wanderung der Carbonylgruppe an das C^5 der Zuckerkette bei der Cyclisierung den stickstoffhaltigen Heterocyclus 50 liefert. Das Entstehen eines aromatischen Systems begünstigt dann die weitere Wasserabspaltung, so dass es zur Bildung von zwitterionischen Pyridiniumbetainen des Typs 49 kommen sollte.

Unter den Bedingungen der Maillard-Reaktion bilden sich zahlreiche Heterocyclen. Derartige Verbindungen sind auch wesentliche Bestandteile der Röstaromen von Lebensmitteln (3-7).

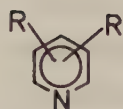
Während bei der Thermolyse von Kohlenhydraten in Abwesenheit von Aminen überwiegend Furan-Derivate entstehen, treten bei Umsetzungen von Zuckern mit Aminen N-haltige Heterocyclen in den Vordergrund. Vor allem mit Hilfe der GC/MS-Technik konnten in den flüchtigen Anteilen entsprechender Reaktionsmischungen, sowie in einer Reihe von Röstaromen viele verschiedenartig substituierte Pyrrole, Oxazole, Thiazole und Pyrazine identifiziert werden (3-7, 92, 93).

Demgegenüber ist über die Bildung von Pyridinderivaten bei Maillard-Reaktionen bisher nur wenig bekannt (94). Einige alkylsubstituierte Pyridine der allgemeinen Struktur 54 wurden in Lebensmitteln wie z.B. geröstetem Lamm (95), fritiertem Rind- und Hühnerfleisch (96, 97), sowie gerösteten Nüssen (98, 99) und Kaffee (100) gefunden. Dabei werden ihnen eher unangenehme Aromaeigenschaften zugeschrieben (94, 101).

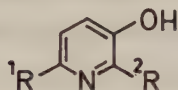
Auch die Bildungsweise solcher Alkylpyridine aus Aminosäuren wurde eingehend untersucht (101, 102).

Über 4-Hydroxypyridine, die als γ -Pyridone vorliegen, und die typische Produkte des Abbaus von Disacchariden über den 1-Desoxyweg sind, habe ich bereits ausführlich berichtet.

Es ist lange bekannt, dass Furfural beim Erhitzen mit Ammoniak, bzw. Ammoniumsalzen, neben 2-Formylpyrrol auch 3-Hydroxypyridin 55a bildet (103).



54



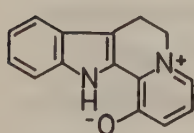
55

- | | | |
|----|-------------------------------------|----------------------------------|
| a. | ¹ R = H | ² R = H |
| b. | ¹ R = CH ₃ | ² R = H |
| c. | ¹ R = H | ² R = CH ₃ |
| d. | ¹ R = CH ₂ OH | ² R = H |

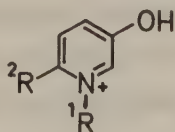
Aso zeigte auch, dass beim Erhitzen von Glucose mit Ammoniak 3-Hydroxy-6-hydroxymethylpyridin 55d entsteht (104) und schliesslich wurden die Verbindungen 55a, b und 55d im Pyrolyseprodukt eines nicht dialysierbaren Melanoidins aus Glucose und Ammoniak nachgewiesen (105, 106). Die Bildung folgt dabei dem Reaktionsmechanismus in Abbildung 7. Das Betain 49 kann durch Protonenwanderung für den Fall, dass R=H leicht in ein Neutramolekül umgewandelt werden.

Auch in einem Umsetzungsgemisch von Glucose und Glycin wurden 3-Hydroxypyridine mit den Strukturen 55b, c und 55d gefunden (107). Shimizu und Mitarb. konnten 3-Hydroxypyridin sogar in Gerstenmalz nachweisen (108). Durch den bereits eingangs beschriebenen Streckerabbau findet hier ein Einbau der primären Aminfunktion der Aminosäure als Ammoniak, unter Reduktion des Zuckermoleküls statt.

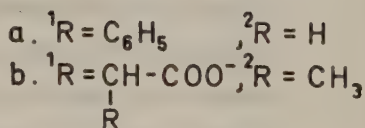
Eine grössere Bedeutung haben aber wohl Umsetzungen, in denen C,N-Bindungen von Aminosäuren erhalten bleiben. Es stellte sich damit die Frage, ob bei Reaktionen von Zuckern mit Aminosäuren oder Lysinseitenketten von Proteinen auch 3-Oxypyridiniumbetaine der allgemeinen Struktur 49 gebildet werden. Bislang sind Betaine dieser Art als Produkte der Maillard-Reaktion in der Literatur nicht beschrieben. Lediglich Severin und Bräutigam (109) isolierten 1973 unter anderem die Verbindung 56 aus einem Reaktionsgemisch von Typtamin mit Xylose bzw. Glucose.



56



57

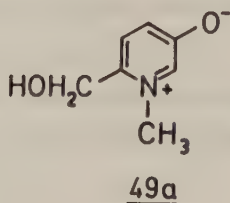


3-Hydroxypyridiniumsalze kennt man hingegen schon länger. So konnten Zincke und Mühlhausen (110), sowie Foley und Mitarb. (111) aus Furfural mit Anilin/Salzsäure das Pyridiniumsalz 57a erhalten. Undheim und Greibrokk (112) haben Schiff'sche Basen aus HMF und verschiedenen Aminosäuren katalytisch hydriert und die gebildeten Reduktionsprodukte zu Pyridiniumbetainen der Struktur 57b umgelagert. Aus der Sicht des Lebensmittelchemikers ist dieser Weg jedoch nicht ganz realistisch, da es fraglich ist, ob der katalytischen Hydrierung entsprechende Reduktionen bei Maillard-Reaktionen auftreten.

Die Mehrzahl der oben beschriebenen Pyridinverbindungen konnte extrahiert und teilweise sogar destilliert bzw. gaschromatographisch bestimmt werden. Dies kann man von Verbindungen des Typs 49 aufgrund ihrer zwitterionischen Struktur nicht erwarten. Die sich daraus ergebenden Schwierigkeiten in der Analytik sind vermutlich auch der Grund dafür, dass 3-Oxypyridiniumbetaine bisher noch nicht in Maillard-Umsetzungen gefunden wurden.

3.2.2. Isolierung und Nachweismethoden

Ich habe Hydroxymethylfurfural mit Methylamin in wässriger sowie wässrig-alkoholischer Lösung bei verschiedenen pH-Werten erhitzt und aus dem jeweils gebildeten Gemisch von Produkten in relativ grosser Menge das 3-Oxypyridiniumbetain 49a isoliert. Die Struktur dieser Verbindung ergibt sich eindeutig aus den Spektren (s.exp.Teil).



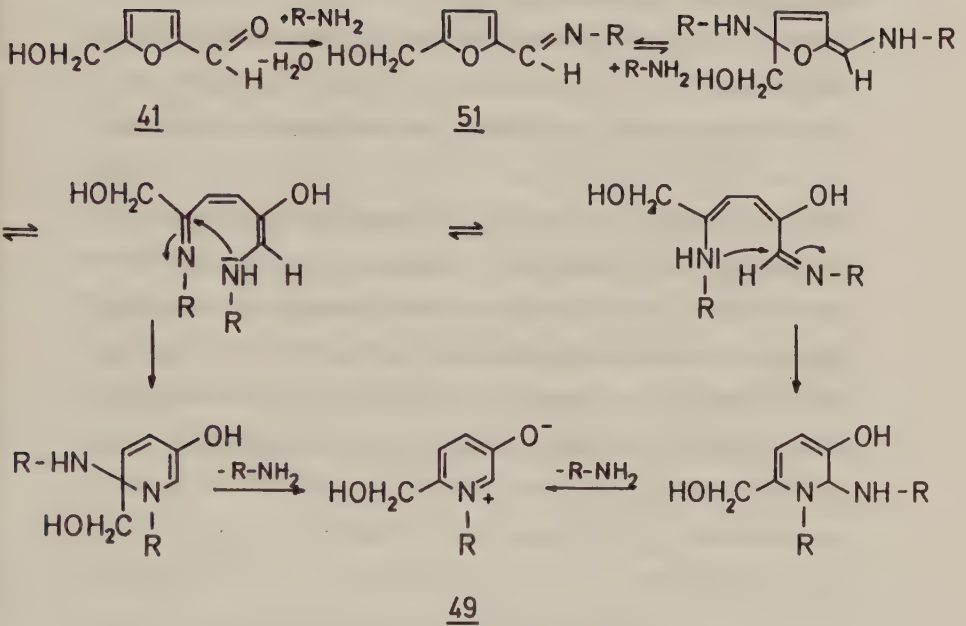
Es zeigte sich, dass das Betain weder extrahierbar noch flüchtig ist, aber dünnschichtchromatographisch gut nachgewiesen werden kann. Das Laufmittel der Wahl für die Chromatographie auf Kieselgel ist dabei reines Methanol. Der Rf-Wert liegt dabei noch wesentlich unter dem Wert von Zuckern. Beim Besprühen mit Eisen(III)chloridlösung ergeben die Verbindungen eine beständige orangerote Färbung, so dass eine Detektion auf diese Weise gut möglich ist.

In dem von mir untersuchten Bereich von pH 5-9 nimmt die Menge des Betains mit steigendem pH-Wert zu. Die Isolierung aus einer schwach alkalischen Mischung ist jedoch schwieriger, da mehr Nebenprodukte entstehen. Aus dem N-Methyl-formylpyrrol 52 wird die Verbindung 49a nicht gebildet. Der elektronenreichere Pyrrolring kann nicht mehr so leicht wie der Furanring des HMF nukleophil durch ein Amin angegriffen werden (vgl. Abb. 8).

Ob Betaine dieser Art auch aus Zuckern gebildet werden und welche Methoden sich zum Nachweis dieser Verbindungen aus komplexen Bräunungsgemischen eignen, war Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Da es sich bei den Pyridiniumbetainen um stark polare Verbindungen handelt, ist die Isolierung und Reinigung schwierig.

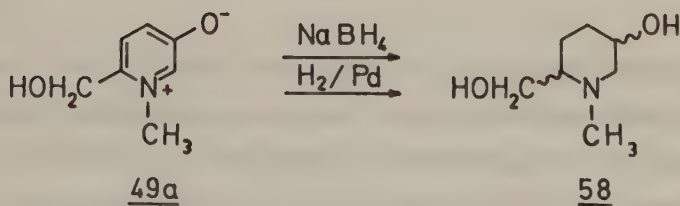
Abbildung 8



Unpolare Substanzen lassen sich mit Essigsäureethylester extrahieren. Vom "Ballast" an noch unumgesetzten Zucker, gebildeten Oligosacchariden sowie den hochmolekularen braunen Melanoidinen muss aber auf eine andere Weise abgetrennt werden. Versuche mit gelchromatographischen Methoden erwiesen sich als wenig brauchbar. Eine

gute Möglichkeit zur Vortrennung der wässrigen Phase bietet hingegen die einfache Säulenchromatographie auf Kieselgel mit polaren Lösungsmitteln (bis hin zu Wasser). Daran schliessen sich Verfahren wie Niederdrucksäulenchromatographie, hochdruckflüssigkeits- oder auch präparativ dünnschichtchromatographische Trennungen an (s.exp.Teil).

Um den Nachweis der Betaine zu vereinfachen und auch in geringeren Konzentrationen zu ermöglichen, untersuchte ich verschiedene Verfahren zur Derivatisierung. So versuchte ich, die Betaine zu den entsprechenden N-Alkyl-3-hydroxypiperidinen 58 zu reduzieren. Die Reduktion der Reinsubstanz 49a mit NaBH_4 in Ethanol (113, 114) gelang in mässiger Ausbeute.



58 ist sowohl nach Bisacetylierung, wie auch unacetyliert gut gaschromatographisch bestimmbar (115), konnte aber auf diese Weise in einem mit NaBH_4 reduzierten Zucker/Methylamin Bräunungsansatz nicht nachgewiesen werden.

Es ist schon lange bekannt (116), dass sich Pyridiniumsalze auch durch katalytische Hydrierung (Pt in Ethanol) in die entsprechenden Piperidinderivate überführen lassen. Durch mehrstündige Hydrierung in Ethanol mit Palladium auf Aktivkohle als Katalysator gelang es mir in guter Ausbeute, das 3-Oxypyridiniumbetain 49a zum 3-Hydroxy-6-hydroxymethyl-1-methylpiperidin 58 zu reduzieren. Mit Hilfe des Gaschromatographen gelang es mir auch in einer erhitzten Mischung von Glucose und Methylamin nach katalytischer Hydrierung indirekt das Pyridiniumbetain 49a nachzuweisen (s.exp.Teil). In dieser Hinsicht ist die katalytische Reduktion der mit Natriumborhydrid überlegen.

Eine weitere Möglichkeit zur Auftrennung der zwitterionischen Verbindungen bietet die Chromatographie an Ionenaustauscherharzen. Neben Arbeiten am Aminosäureanalysator, über die ich später berichten werde, untersuchte ich vor allem, ob sich die Betaine mit Hilfe von Ionenaustauschern

isolieren bzw. anreichern lassen. Es zeigte sich, dass die Betaine von stark sauren Kationenaustauschern zwar sehr gut aus Lösungen absorbiert werden, dass andererseits die Ablösung vom Ionenaustauscher grössere Probleme bereitet. Als vorteilhafter erwiesen sich schwach saure Kationenaustauscher wie z.B. Amberlite IRC 84. Mit Hilfe dieses Ionenaustauschers war eine Anreicherung des Betains 49a aus entsprechenden Fraktionen eines über eine Kieselgelsäule vorgetrennten Bräunungsansatzes von Glucose mit Methylamin möglich. So lag die Verbindung nach anschließender dünnschichtchromatographischer Reinigung in ausreichender Reinheit für die Aufnahme von Spektren vor.

3.2.3. Bildung aus verschiedenen Zuckern und Aminen

Um den Umfang der Bildung von Pyridiniumbetainen aus Zuckern beurteilen zu können, untersuchte ich zahlreiche entsprechende Reaktionsmischungen. So erhitzte ich Glucose mit Methyllumoniumacetat bei verschiedenen pH-Werten (4,5-9) 50-150 h in wässrig-alkoholischer Lösung unter Rückfluss. Das Betain ist unter solchen Bedingungen nach ca. 50h dünnschichtchromatographisch nachweisbar, sowie nach etwa 100h auch isolierbar. Im schwach sauren (pH 4,5) wie auch im schwach alkalischen (pH 9) Medium nimmt die Bildung der Betaine ab, bzw. die nötige Erhitzungsdauer

zu. Im grössten Umfang entstehen die 3-Oxypyridiniumbetaine also im annähernd neutralen Bereich (pH 6-7), der auch in den meisten Lebensmitteln vorliegt.

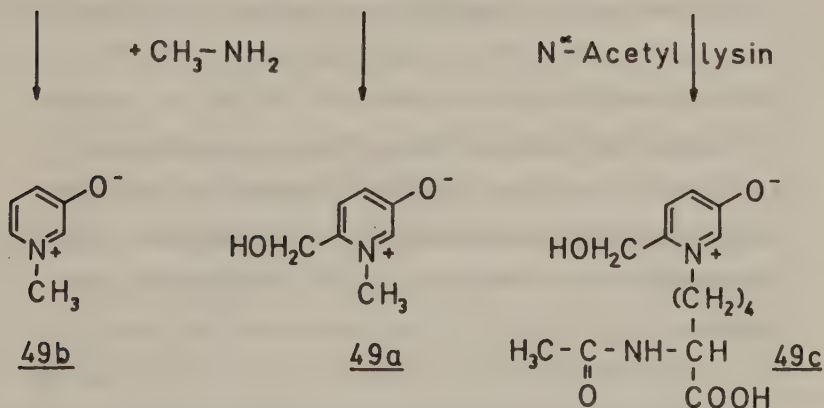
Zur Isolierung des Pyridiniumbetains wurden bevorzugt säulenchromatographische Reinigungsmethoden verwendet. So trennte ich die wässrige Phase der Umsetzungsgemische, nach einer Extraktion mit Essigsäureethylester, zunächst über eine einfache Kieselgelsäule vor. Dabei wird der Anreicherungsgrad ständig dünnschichtchromatographisch kontrolliert. Anschliessend daran werden die entsprechenden Fraktionen an Niederdrucksäulen gereinigt. Vorteilhaft ist dabei, erst eine Kieselgelsäule und danach eine Säule mit Octadecyl-modifizierter Umkehrphase (RP-18) zu verwenden. Um die Betaine in kristalliner Form zu erhalten, ist schliesslich noch eine hochdruckflüssigkeitschromatographische Reinigung notwendig. Auch hier empfiehlt sich die Trennung an einer Kieselgel- und RP-18-Säule (vgl. exp. Teil).

Nach entsprechenden, verlustreichen Trennungen erhielt ich das Pyridiniumbetain 49a in reiner, kristalliner Form in ungefähr 0.1% Ausbeute aus Glucose. Aus Maltose und Lactose entstehen vergleichbare Mengen, während 49a aus Fructose nur in wesentlich geringerem Umfang gebildet wird.

Erhitzt man Xylose mit Methylammoniumacetat, so wird wesentlich rascher ein Pyridiniumbetain der Struktur 49b gebildet. Dies deckt sich mit der, allgemein bei Maillard-Reaktionen zu beobachtenden, grösseren Reaktivität von Pentosen im Vergleich zu Hexosen. Das Pentoseprodukt wurde nach Literaturangaben unabhängig aus 3-Hydroxypyridin durch Methylierung mit Methyljodid synthetisiert (117, 118).

Xylose

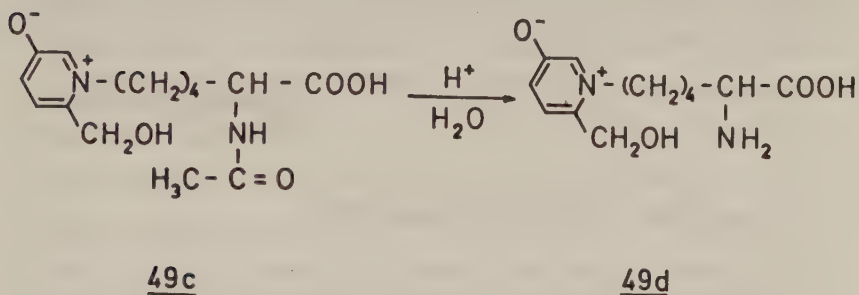
Glucose , Fructose , Maltose , Lactose



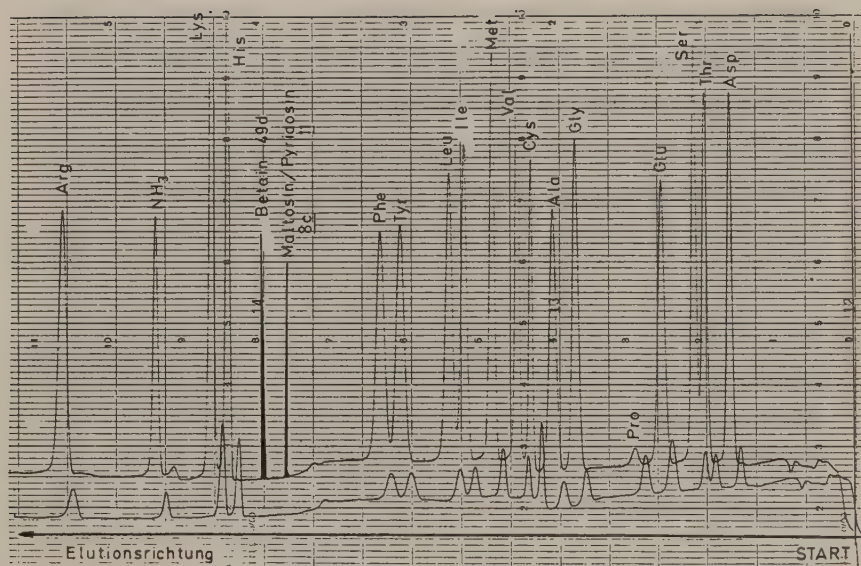
Da an Maillard-Reaktionen in Lebensmitteln vor allem die ϵ -Aminogruppen der Lysinseitenketten beteiligt sind, führte ich auch Umsetzungen mit N^ε-Acetyllysin als einem einfachen Peptidmodell (s.2.1.1.) durch. Erhitzt man dieses

Lysinderivat mit Lactose in wässriger Lösung im neutralen pH-Bereich 7h auf 130°C (im Autoklaven), so lässt sich das Betain 49c in ca. 1%iger Ausbeute (bezogen auf Acetyllysin) isolieren. Auch in einem Ansatz von N -Acetyllysin mit Maltose, der 20h bei pH 7 (Phosphatpuffer) am Rückfluss gehalten wurde, konnte ich 49c in vergleichbarer Menge nachweisen.

Zum Vergleich stellte ich die Verbindung zunächst aus HMF und N -Acetyllysin her (s.exp.Teil). Die Acetylgruppe in 49c lässt sich unter den, für Proteinhydrolysen üblichen Bedingungen abspalten. Da die Verbindung solch drastische



Behandlungen unbeschadet übersteht (s.u.), sollte ein Nachweis von 49d in Proteinen mit Hilfe des Aminosäureanalytators möglich sein. Tatsächlich ergaben entsprechende Untersuchungen, dass 49d im Chromatogramm des Aminosäureanalytators zwischen Lysin und Pyridosin bzw. Maltosin (s. 2.1.1.) erscheint.



Elution der Aminosäuren am Aminosäureanalysator

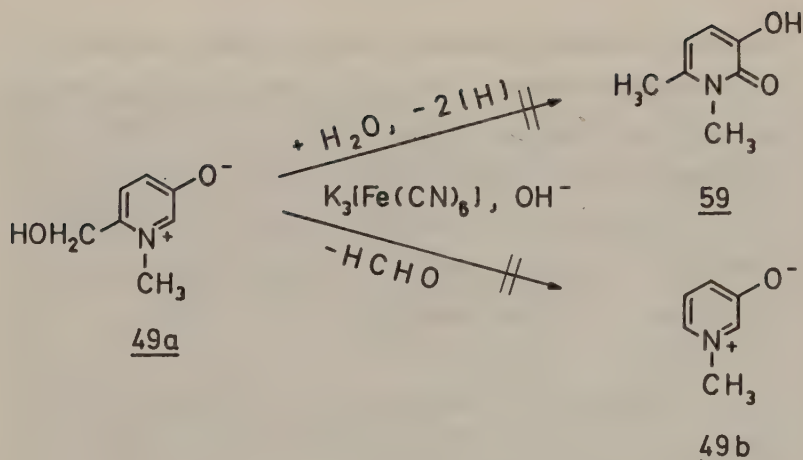
(49d und 8c/11 eingefügt)

3.2.4. Reaktivität und Folgeprodukte

Da die Betaine erst nach relativ langer Reaktionszeit in grösseren Mengen gebildet werden, liegt der Schluss nahe, dass es sich bei diesen Verbindungen um vergleichsweise stabile, reaktionsträge Endprodukte des 3-Desoxyabbauweges handelt. Um diese Frage zu klären, setzte ich das Betain 49a unter verschiedenen Bedingungen um. Es ergab sich,

dass die Verbindung gegenüber Säuren (6N-HCl, methanol. HCl), Laugen (2N-NaOH), C,H-aciden- und Carbonylverbindungen auch bei längerem Erhitzen stabil ist. Als potentielle organische Reaktionspartner wählte ich reaktive Verbindungen, wie sie als Zwischenstufen im Verlauf der Maillard-Reaktion entstehen (Furfurol, 2,3-Dihydro-4-hydroxy-5-methyl-furan-2-on, Verbindung 7).

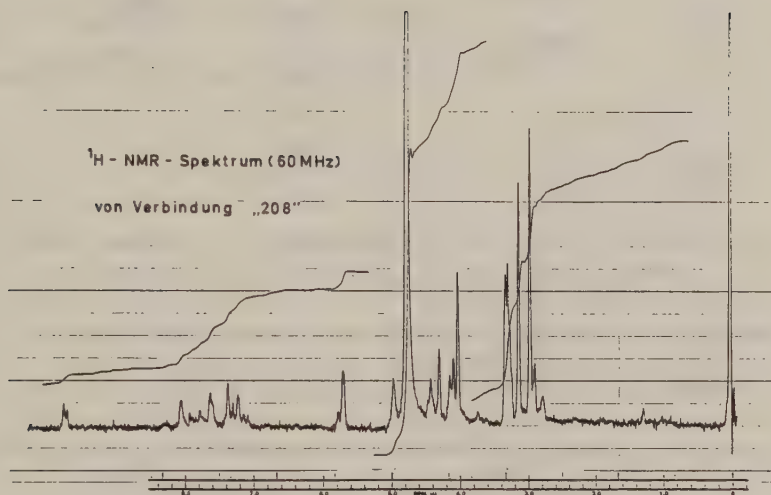
Bei der Einwirkung von Natronlauge erfolgte auch nach Zugabe von Hexacyanoferrat(III) weder "Decker-Oxidation" über die Pseudobase zum Pyridon 59 (119), noch Abspaltung der Hydroxymethylgruppe als Formaldehyd, wie sie von Golding und Katritzki (120) und Weber (121) bei Pyridiniumsalzen, sowie von Severin und Bräutigam (109) auch bei 3-Oxypyridiniumbetainen beobachtet wurde. Dies deckt sich mit den Befunden von Möhrle und Weber (122), die zeigten, dass 1-Methylpyridinium-3-olat 49b bei Behandlung mit alkalischer Hexacyanoferrat(III)lösung stabil ist. Dagegen konnten Tosato und Mitarb. in geringen Mengen Autoxidation der Verbindung zum 3-Hydroxy-1-methyl-2-pyridon beobachten (123).



Nach Erhitzen von 49a in DMF auf 150°C konnte ich jedoch die Bildung zweier neuer Verbindungen beobachten. Die Auftrennung und Reinigung der beiden Substanzen gelang mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (s. exp. Teil).

Die Struktur des einen Reaktionsprodukts, das ein Molekulargewicht von 208 aufweist, konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden. Die Spektraldaten geben jedoch Hinweise auf eine Reaktion von 49a mit DMF. Im NMR-Spektrum (Abb.9) sind deutlich die beiden N-CH_3 -Gruppen bei 3,00 sowie bei 3,16 ppm zu sehen, während das restliche Spektrum nur schwer zu interpretieren ist. Das Molekulargewicht der Verbindung ergäbe sich aus einer Addition von DMF an das Betain 49a unter zweimaliger Oxidation (minus 4 H).

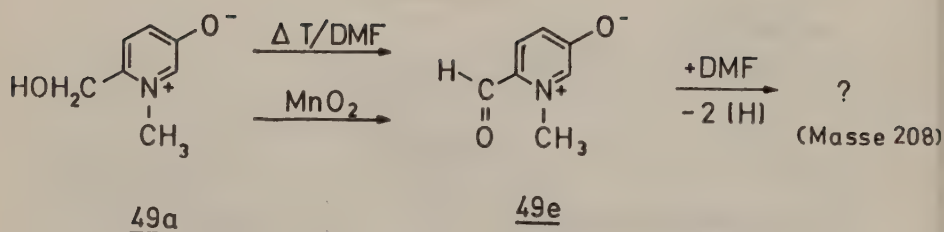
Abbildung 9



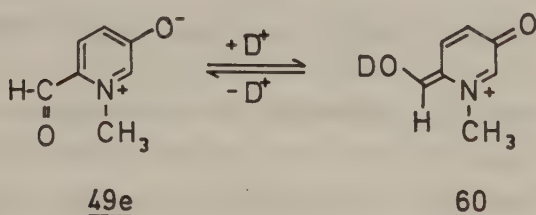
Von Bedeutung für die Reaktion scheint dabei die CH_2OH -Gruppe zu sein, da eine vergleichbare Verbindung aus 49b nicht hergestellt werden konnte. 49b ist beim Erhitzen in DMF stabil. Dies zeigt, dass die reaktionsfähige Stelle der Pyridiniumbetaine die Hydroxymethylgruppierung ist.

Das zweite unbekannte Reaktionsprodukt konnte strukturell aufgeklärt werden. Es handelt sich dabei um das Oxidationsprodukt 49e.

Auch durch Oxidation von 49a mit frisch gefälltem Braunstein (124, 125) konnte ich 49e erhalten.



Die NMR-Daten liessen erst nach Zugabe von einigen Tropfen DCl eine eindeutige Interpretation zu. Grund dafür ist vermutlich, dass 49e in neutraler Lösung (CD_3OD) im Gleichgewicht zur deuterierten Form 60 steht.



So misst man das in Abbildung 10 dargestellte NMR-Spektrum, in dem beide Formen an ihren Signalen zu erkennen sind. Durch Zugabe von DCl wird 49e vollständig in 60 übergeführt, wie aus dem NMR-Spektrum (Abb. 11) zu erkennen ist.

Zur Diskussion der NMR-Spektren von 3-Oxypyridiniumbetainen sei auf die Literatur verwiesen, in der auch auf einen möglichen β -Pyridoncharakter der Verbindungen weiter eingegangen wird (126, 127).

Abbildung 10

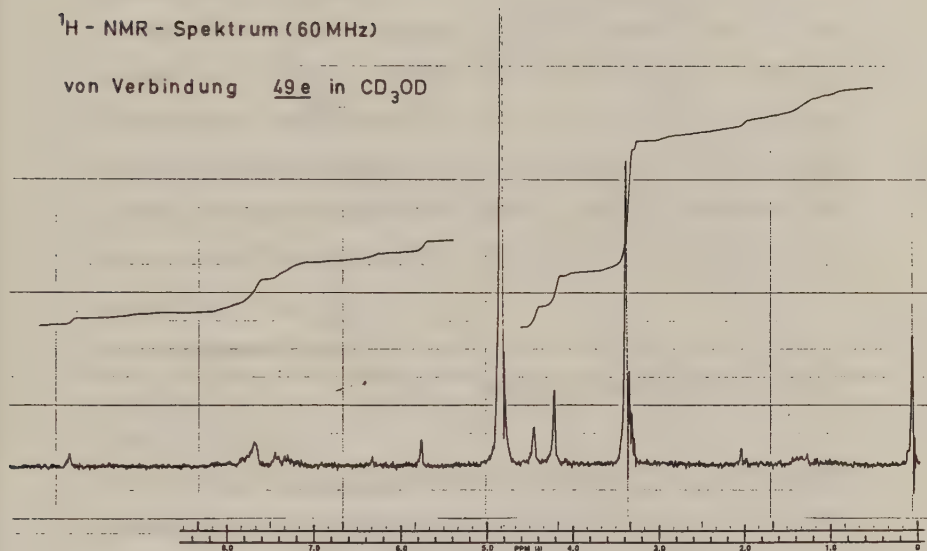
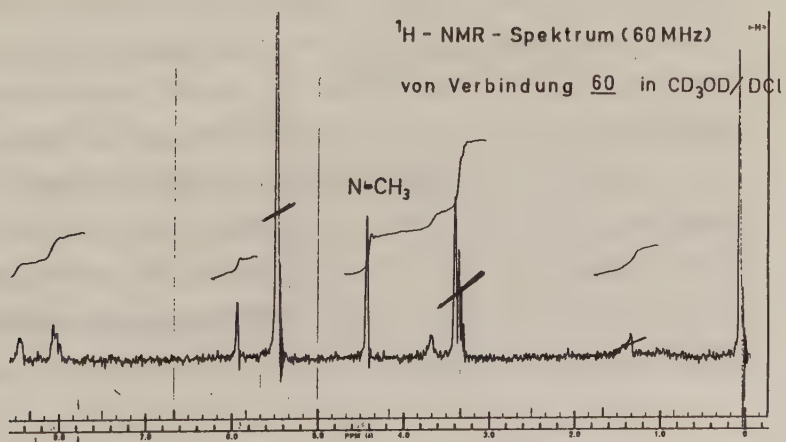


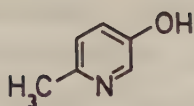
Abbildung 11



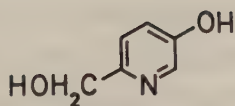
Aufgrund der dargelegten Versuche kann man annehmen, dass 3-Oxipyridiniumbetaine auch in Lebensmitteln gebildet werden. Da die Betaine vergleichsweise langsam entstehen und nur geringe Reaktivität besitzen, sollte ein Nachweis vor allem in lange oder hoch erhitzten Lebensmitteln möglich sein. Als empfindliche Nachweismethode für die Routineanalytik bietet sich die Untersuchung der Proteinhydrolysate mit dem Aminosäureanalysator an.

3.2.5. Bildungsmechanismus

Für die Bildung von Pyridiniumbetainen aus Zucker kommen mehrere reaktionsfähige Vorstufen in Betracht. Es könnte zunächst HMF entstehen, das nach Ringöffnung und Einbau des Amins zum Pyridiniumsystem cyclisiert (Abb. 8). Wahrscheinlicher ist aber, dass der Stickstoff bereits in einer offenkettigen Vorstufe eingebaut wird und der Reaktionsverlauf nach Abbildung 7 erfolgt. So reagiert wie bereits dargelegt das Formylpyrrol 51, das in Zucker/Amin Ansätzen den Anteil an gebildetem HMF bei weitem überwiegt (91), nicht zu Pyridiniumbetainen. Nyhammar und Mitarb. formulierten kürzlich nach eingehenden mechanistischen Untersuchungen mit ¹⁴C-markierter Glucose die Bildung von 55b aus Glycin ebenfalls über Zwischenstufen, wie sie in Abb.7 gezeigt sind (128).

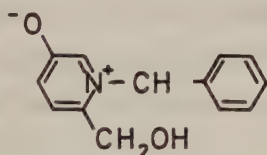


55b



55d

Auch die Synthese von Elming und Clauson-Kaas, von denen 55b und 55d aus 2-Aminomethyl-5-hydroxymethylfuran hergestellt werden konnte, läuft über vergleichbare Zwischenstufen (129). Im Gegensatz dazu sind 5-Aminozucker, aus denen Paulsen, Todt und Heyns z.B. die Verbindung 61 darstellten (130), als Zwischenstufen der Maillard-Reaktion unwahrscheinlich.

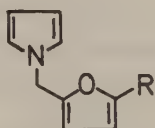


61

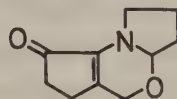
3.3. Prolinspezifische Reaktionsprodukte

Während die Reaktion von Zuckern mit primären Aminen über den 3-Desoxyabbauweg bereits eingehend untersucht ist, weiss man über charakteristische 3-Desoxyabbauprodukte der Zucker mit sekundären Aminen bislang nur wenig. So konnten Tressl und Mitarb. bei ihren intensiven Untersuchungen über Prolin und Hydroxyprolin-spezifische Maillard-Produkte

Furfurylpyrrole der Struktur 62, sowie einige andere typische Produkte des 3-Desoxyweges aus Modellumsetzungen von Zuckern mit den sekundären Aminosäuren isolieren, wobei die Pyrrolbildung nur bei Hydroxyprolin als Reaktionspartner auftritt .



62 $R = \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{OH}$



63

Auch das tricyclische Malzoxazin 63, eine Substanz, die aus Malz isoliert werden kann, wird vermutlich über den 3-Desoxyabbauweg aus Disacchariden gebildet. Tressl (63) schlug 1982 einen Reaktionsverlauf über den 1-Desoxyabbauweg vor.

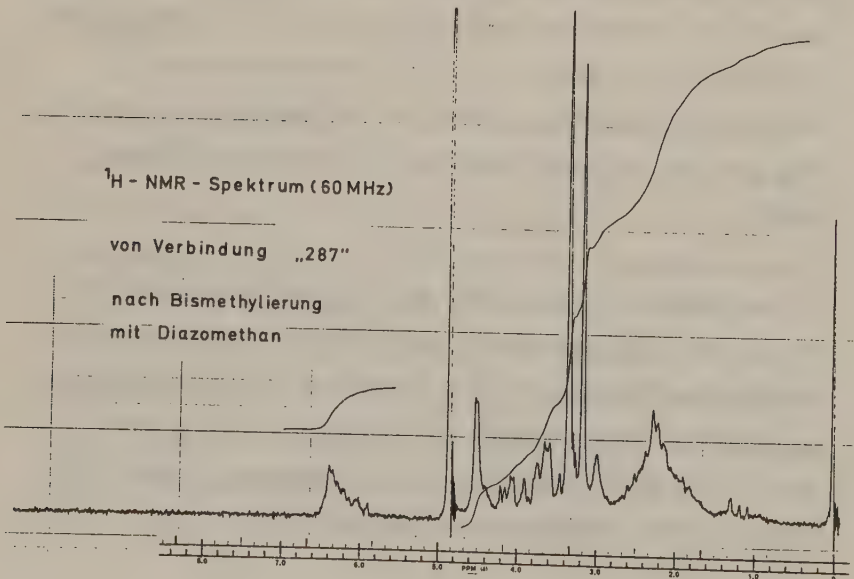
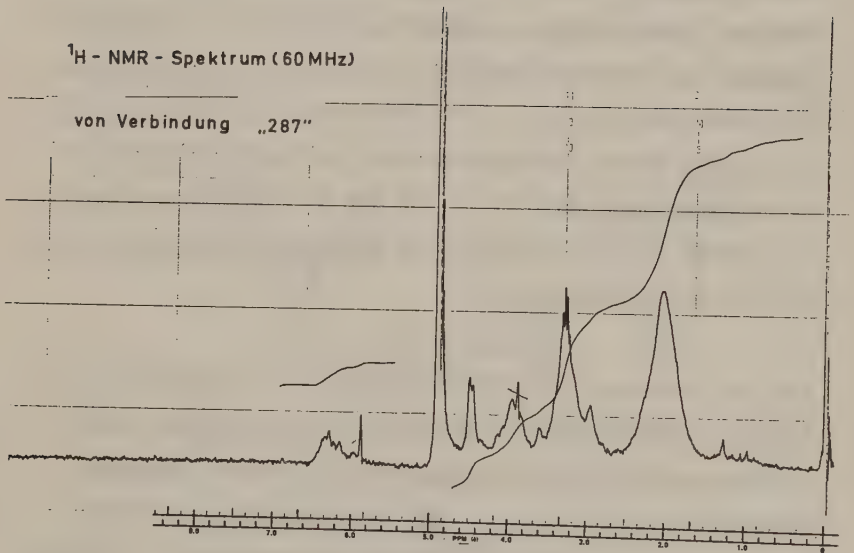
Ich erhitzte Prolin mit HMF in Ethanol einige Stunden unter Rückfluss und isolierte eine polare Verbindung mit dem Molekulargewicht 287. Die Substanz verbleibt bei der Extraktion des Umsetzungsgemisches mit Essigsäureethylester in der wässrigen Phase. Die dünnschichtchromatographische Reinigung wird durch noch unumgesetztes Prolin erschwert. Die Verbindung ist nur wenig polarer als Prolin und liess sich mit den von mir gewählten Methoden nicht Prolin-frei gewinnen (s.u.). Die Umsetzung mit Diazomethan (nach Entfernung des Wassers und

Lösen in Methanol) erleichtert das Trennproblem erheblich. Obwohl die Verbindung 2-fach methyliert wird (MS und NMR-Spektren; vergl.exp.Teil) ändert sich ihre Polarität nicht wesentlich. Sie kann daher gut vom unpolaren Prolinmethylester abgetrennt werden. Die Substanz zeigt Fluoreszenzlösung und lässt sich auch gut mit Ehrlich's-Reagenz (Dimethylaminobenzaldehyd/HCl) auf der DC-Platte detektieren (intensive Violettfärbung). Mit Dinitrophenylhydrazin reagiert die Verbindung nicht.

Bei der Umsetzung der Reaktionspartner in Wasser wird die Substanz nicht gebildet. Unter diesen Bedingungen (H_2O , 100°C) reagiert HMF erstaunlicherweise nahezu überhaupt nicht mit Prolin. Auch aus HMF und Pyrrolidin wird die Substanz nicht gebildet, obwohl die Masse für die Reaktion von zwei Molekülen Hydroxymethylfurfural mit einem Molekül Pyrrolidin unter Austritt von zwei Molekülen Wasser spricht. In Abbildung 12 sind die NMR-Spektren der Verbindung vor und nach der Umsetzung mit Diazomethan dargestellt:

Vor der Methylierung ist der noch relativ hohe Anteil an Prolin (ca. 50%) erkennbar, das Spektrum zeigt aber auch olefinische Protonen bei 6-6,5 ppm. Das Duplett mit geringer Kopplungskonstante bei 4,5 ppm lässt auf ein oder zwei, durch elektronenziehende Nachbargruppen entschirmte Methylen- bzw. Methinprotonen schliessen.

Abbildung 12



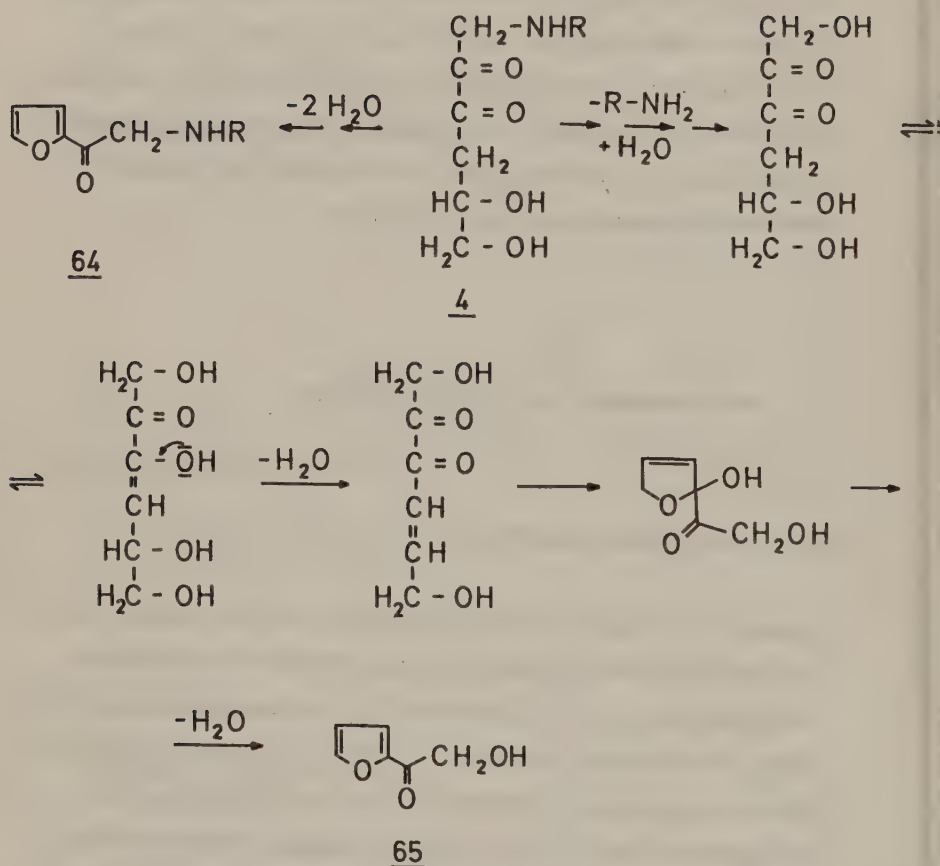
Die Methylierung mit Diazomethan bewirkt eine wesentlich bessere Auflösung des Spektrums. Deutlich sind die beiden N- oder O-Methylgruppen bei 3,2 und 3,35 ppM zu sehen. Eine eindeutige Strukturzuordnung auf Grund der bisherigen Spektraldaten ist aber nicht möglich. So sind noch weitere Untersuchungen notwendig, um die Struktur und eventuelle Bedeutung dieses Produktes aufzuklären.

4. Untersuchungen zum 4-Desoxyabbauweg

4.1. Hydroxyacetylfuran

Wesentlich weniger intensiv erforscht als die beiden bisher besprochenen Abbauwege ist der Verlauf der Zuckermwandlung über die 4-Desoxyzucker 4. So isolierten erst im Jahre 1952 Miller und Cantor (132) das Hydroxyacetylfuran 65 aus einem sauer erhitzten Ansatz von Saccharose als Nebenprodukt der HMF-Herstellung. Hydroxyacetylfuran ist ein charakteristisches Produkt des 4-Desoxyabbauweges der Zucker (Vgl. Abb.13).

Abbildung 13



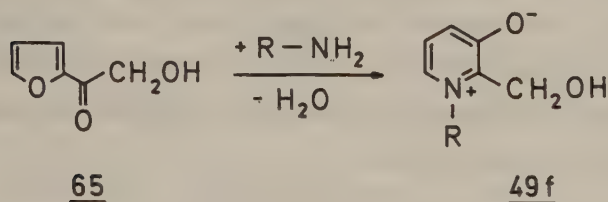
Wird die Aminfunktion am C¹ nicht ausgetauscht, so entstehen Aminoacetylfurane 64 (47), von denen allerdings bislang lediglich das Furosin 10 grössere Bedeutung erlangt hat.

Hydroxyacetylfuran entsteht bevorzugt im Säuren. Dabei erhält man ohne Aminzusatz (Vgl.133) aus Fructose wesentlich grössere Mengen als aus Glucose (134, 136). Dies ist verständlich, da lediglich Fructose zur 2,3-Enolisierung und damit zur Wasserabspaltung am C⁴ befähigt ist. (Vgl. Abb.1). Wieweit nun im Verlauf einer Maillard-Reaktion (Amingegenwart, etwa neutraler pH) der 4-Desoxyabbauweg beschränkt wird, ist schwer einzuschätzen. Einerseits findet man in entsprechenden Umsetzungsgemischen relativ geringe Mengen Hydroxyacetylfuran 65 und Aminoacetylfurane 64 konnten bislang überhaupt noch nicht identifiziert werden. Andererseits wird das Hydroxyacetylfuran, wie ich zeigen konnte, bei neutralem pH und Amingegenwart sehr schnell unter Bildung zahlreicher, farbiger Substanzen abgebaut. Das Spektrum reicht dabei von roten und gelben bis hin zu grünen Produkten, die aber rasch zu braunen Polymerisaten weiterreagieren und daher nicht genauer charakterisiert werden konnten.

Heyns und Hauber konnten sogar zeigen (136), dass Bräunungspolymerisate aus Sorbose, einem Ketozucker, zu einem grossen Teil durch Polykondensation von Hydroxyacetylfuran entstanden sind. Möglicherweise wandelt sich Hydroxyacetylfuran also sehr schnell in polymere und farbige Folgeprodukte um, die sich der bisherigen Analytik entziehen und dadurch die Bedeutung dieses Abbauweges nicht erkennen lassen.

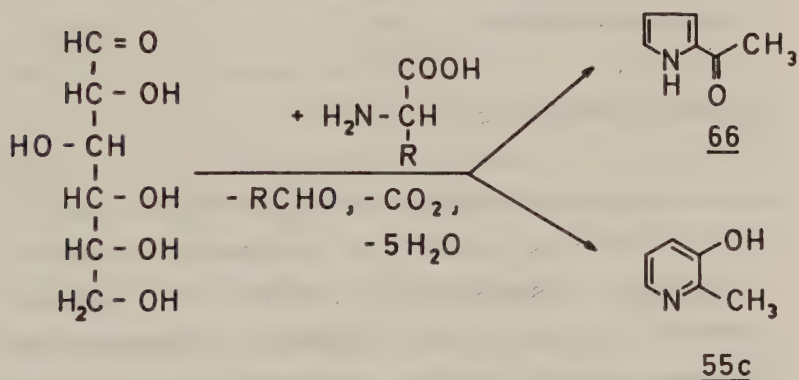
4.2. Isomere 3-Oxipyridiniumbetaine

Ich habe Hydroxyacetylfuran mit Methylanmoniumacetat bei pH 7 (Phosphatpuffer) in wässriger Lösung 15 Stunden im Autoklaven erhitzt. Die dabei entstandenen, unpolaren braunen Polymerisate wurden abfiltriert und verworfen. Aus der wässrigen Lösung isolierte ich dünnschichtchromatographisch das Pyridiniumbetain 49f (s.exp.Teil). Aus dem, dem Hydroxymethylfurfural isomeren Hydroxyacetylfuran entsteht also ganz entsprechend dem Reaktionsverlauf in Abb. 8 das zu 49a isomere Betain 49f. Da die Ausbeute jedoch schlecht ist, unternahm ich keine weiteren Versuche, die Verbindung als Zuckerumwandlungsprodukt zu identifizieren.



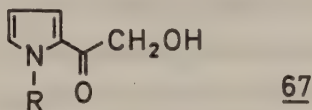
Die Struktur von 49f konnte durch eine einfache, unabhängige Synthese gesichert werden. Dazu wurde 3-Hydroxypyridin nach Literaturangaben (137, 138) in 2-Stellung hydroxymethyliert und anschliessend N-methyliert.

Nach den Ergebnissen von Nyhammar u. Mitarb. bilden sich 2-substituierte N-Alkyl-3-hydroxypyridine wahrscheinlich auch über offenkettige Vorstufen aus Zuckern. Bei ihren eingehenden Untersuchungen zur Reaktion von Glucose mit Glycin fanden sie unter anderem auch die durch Streckerabbau reduzierten Verbindungen 66 und 55c. Nach Experimenten mit 1-¹³C-markierter Glucose postulierten sie für beide Verbindungen einen Bildungsmechanismus über gleiche Vorstufen (139).



Erstaunlich ist dabei, dass die CH₃-Gruppe der Verbindungen 66 und 55c nach diesen Ergebnissen das C⁶ der Zuckerkette repräsentiert. Welche Konsequenzen sich daraus evtl. für den Bildungsmechanismus des Hydroxyacetylfurans ergeben könnten, soll hier nicht diskutiert werden. Es ist

bekannt, dass dem Hydroxyacetylfuran analoge 1-Alkyl-2-hydroxyacetylpyrrole 67 bei der Reaktion von Zuckern mit primären Aminen entstehen (91).



5. Halbquantitative Untersuchungen zur Bedeutung der einzelnen Abbauewege

5.1. Einleitung

Beim Erhitzen von Zuckern entsteht eine Vielzahl von Reaktionsprodukten. Je nach Wahl der Bedingungen verlagert sich dabei das Schwergewicht der Reaktion auf die Bildung einer oder mehrerer spezieller Substanzen. Einen allgemein gültigen Überblick über die tatsächliche Bedeutung der einzelnen Verbindungen zu gewinnen, ist daher schwierig. Von ebenso grosser Bedeutung für die Richtigkeit quantitativer Aussagen ist die Wahl des Analysenverfahrens. Da es aufgrund der grossen Vielfalt der entstehenden Strukturen keine universelle Methode zum Nachweis aller Maillard-Produkte gibt und viele Verfahren teilweise verlustreiche

Anreicherungs-schritte beinhalten, sind quantitative Aussagen über den Gehalt einzelner Substanzen in Bräunungsgemischen problematisch. In der Regel sind jedoch Abschätzungen über die Größenordnung der Konzentration und Vergleiche zum Gehalt anderer bekannter Reaktionsprodukte möglich.

5.2. Karamellisierung von Glucose

Im Zusammenhang mit den Vorgängen bei der Maillard-Reaktion war von Interesse, wie sich Zucker beim Karamellisieren, d.h. dem Erhitzen ohne Zugabe von Aminen oder anderen Stoffen verhalten. Unter solchen Bedingungen findet Wasserabspaltung zu Oligosacchariden und Anhydrozukkern statt (36, 140, 141). Auch in saurer Lösung lässt sich dies beobachten, wobei der Umfang der Wasserabspaltung stark vom Lösungsmittel und Art des Zuckers abhängig ist (37, 38, 142). So entstehen aus Glucose in saurer, wässriger Lösung nur sehr geringe Mengen Anhydrozucker im Gleichgewicht. Die Bildung von Isomaltose durch Reversion wurde bereits 1890 von Emil Fischer (145) beobachtet.

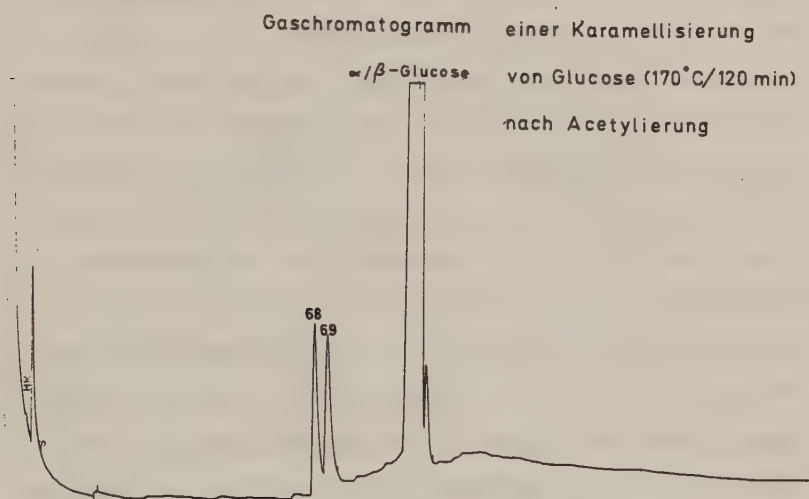
Ich erhitzte Glucose trocken 30-150 min auf 170°C und verfolgte die Bildung gaschromatographisch erfassbarer Verbindungen. Dabei lässt sich ohne Derivatisierung auf einfache Weise lediglich Hydroxymethylfurfural nachweisen. Obwohl es nur in geringen Konzentrationen (<100 ppM) vorliegt, ist der Nachweis nach einer erschöpfenden Extraktion mit Methylenchlorid einfach und genau zu führen.

Acetyliert man die schwachbraune Karamellisierungsschmelze mit Acetanhydrid in Pyridin, so lassen sich auch polare, niedermolekulare Substanzen gaschromatographisch bestimmen. Auch die Silylierung erweist sich als praktikable Derivatisierungsmethode (s.exp.Teil). Es zeigte sich, dass der Anteil an nicht umgesetzter Glucose über 80% der auf diese Weise erfassbaren Verbindungen beträgt.

Eine enzymatische Untersuchung der 120 min lang erhitzten Schmelze ergab, dass die Glucose tatsächlich aber nur noch zu etwa 17% unverändert vorliegt. Zählt man dazu den Anteil der restlichen, nach Acetylierung gaschromatographisch erfassbaren Verbindungen, der sich auf ungefähr 4.5% berechnen lässt ergibt sich, dass lediglich 22% der Schmelze mit dieser Analysenmethode bestimmt werden. Rund 3/4 der Glucose reagieren also zu vermutlich höhermolekularen Verbindungen, die sich der gaschromatographischen

Analytik entziehen. Die Oligosaccharide, die einen Gross-
teil dieser Verbindungskasse stellen, wurden bereits von
Sugisawa und Edo (36) eingehend untersucht.

Neben Glucose treten im Gaschromatographen noch zwei Peaks
mit jeweils ca. 7% auffällig in Erscheinung:

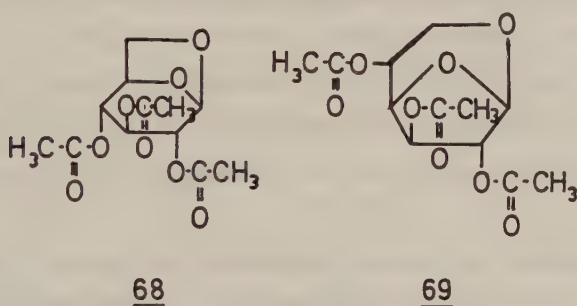


Eine Absicherung der Vermutung, es könnte sich um die ace-
tylierten 1,6-Anhydroformen der Glucose 68 und 69 handeln,
scheiterte an der mangelnden Aussagekraft von Elektronen-
stoss-Massenspektren. Die Verbindungen sind zu wenig

flüchtig, oder werden durch den Elektronenbeschuss so energiereich, dass sie uncharakteristische Bruchstücke abspalten, ohne einen Molekülpeak zu ergeben.

Da der Nachweis über GC/MS-Kopplung demzufolge nicht eindeutig war, versuchte ich, die Substanzen aus der Schmelze zu isolieren. Eine Anreicherung der beiden Verbindungen auf ca. 50% gelang durch Aufziehen des Umsetzungsgemisches auf Cellulose und anschliessende Elution mit Essigester, oder, einfacher, durch 24-stündige flüssig/flüssig Extraktion mit Essigsäureethylester. Zur weiteren Reinigung boten sich zwei Möglichkeiten an. So konnte ich die Substanzen nach Acetylierung und gaschromatographischer Trennung an gepackten Säulen bei Verwendung eines Wärmeleitfähigkeitsdetektors präparativ in geringen Mengen in fast 100%iger Reinheit erhalten. Die Isolierung grösserer Mengen gelang mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie. Hiermit war es möglich die Verbindungen nach Acetylierung über eine semipräparative RP-18 Säule vollständig vom Zucker abzutrennen. Die Trennung der beiden Substanzen voneinander gelang durch Wahl eines noch polareren Laufmittels, wobei die Verbindung 68 ab einem gewissen Anreicherungsgrad auskristallisierte (Vgl.exp.Teil).

Das IR-Spektrum der Verbindung war identisch mit dem von kommerziell erhältlicher 1,6-Anhydro-tri-O-acetylglucopyranose 68. Die andere Verbindung erwies sich als die zweite bevorzugte Anhydroform der Glucose, die 1,6-Anhydro-tri-O-acetylglucofuranose 69 (144, 145). Massenspektren, die mit Hilfe chemischer Ionisation aufgenommen wurden, zeigten in beiden Fällen deutlich den Molekülpeak bei 289 (M+1).



Zur Diskussion der ¹H- und der ¹³C-NMR-Spektren (s.exp. Teil) sei auf die entsprechende Literatur verwiesen (146, 147).

Da die Konzentration der Anhydrozucker in der Schmelze hoch genug für die direkte gaschromatographische Bestimmung nach Acetylierung war, kann über die enzymatische Zuckeranalyse auf ihren tatsächlichen Gehalt geschlossen

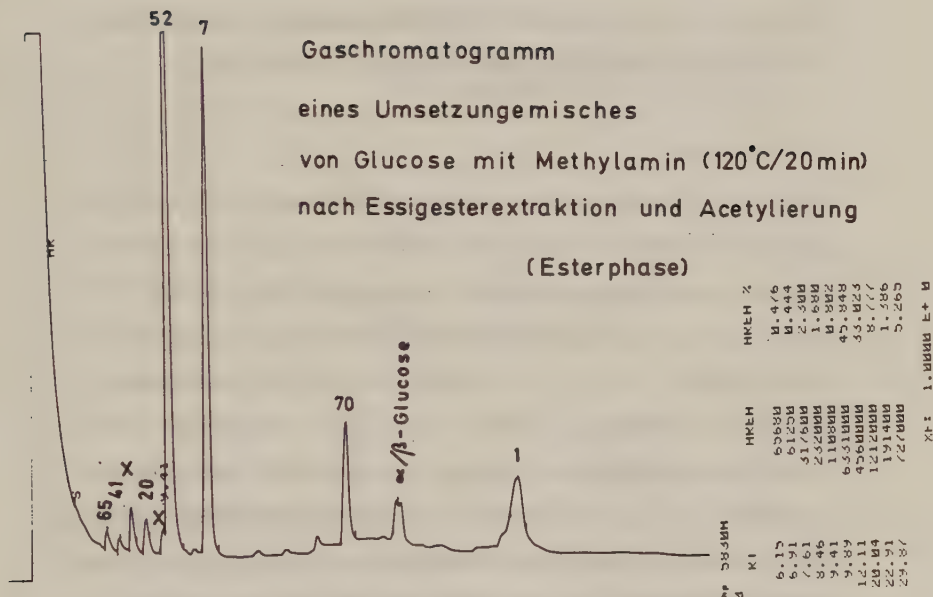
werden. Danach liegen die Anhydrozucker in der karamellisierten Schmelze (170°C/120min) in Konzentrationen von jeweils bis zu maximal 2% vor.

5.3. Umsetzungen von Glucose mit primären Aminen

Ziel meiner Untersuchungen war es nun, über den Gehalt verschiedener gaschromatographisch erfassbarer Substanzen in einem einfachen Modellsystem Rückschlüsse auf die Bedeutung der einzelnen Zuckerabbauwege zu ziehen. Dazu wählte ich die Umsetzung von Glucose mit primären Aminen (Methylamin, Propylamin) bei annähernd neutralem pH (6-7).

Entsprechende äquimolare Mischungen wurden ohne Lösungsmittel 15-20 min auf 120°C erhitzt und nach Lösen in Wasser mit Essigsäureethylester extrahiert. Der Rückstand der organischen Phase wurde in Pyridin gelöst und mit Acetanhydrid acetyliert. Nach Destillation am Hochvakuum untersuchte ich die Proben gaschromatographisch. Abbildung 14 zeigt ein typisches Chromatogramm einer solchen Umsetzung.

Abbildung 14



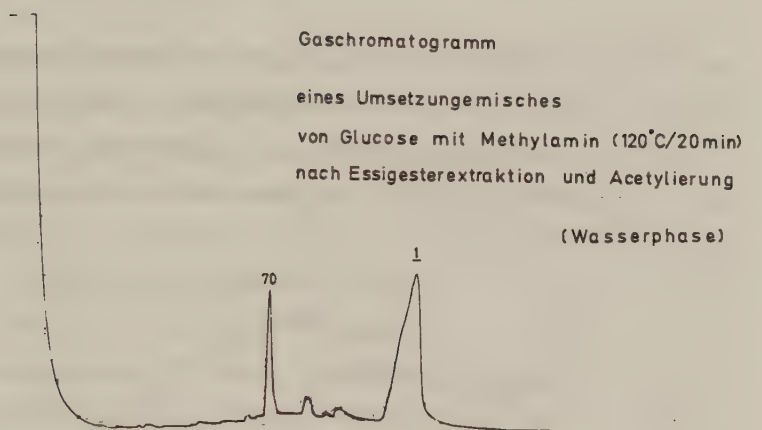
Die Identifikation der Peaks erfolgte mit Hilfe von Vergleichssubstanzen. So konnte ich neben Hydroxyacetylfuran 65, Hydroxymethylfurfural 41 und Acetylformoin 20 vor allem das N-Alkyl-2-formyl-5-hydroxymethylpyrrol 52 sowie das 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methylpyran-4-on 7 als weniger polare Hauptprodukte nachweisen. Eine intensivere Untersuchung der leichtflüchtigen, unpolaren Substanzen

war aber von untergeordnetem Interesse. Über die Produkte, die in diesem Bereich gaschromatographisch erfassbar sind, wurde bereits von Jurch und Tatum (91), sowie kürzlich von Hayase und Kato (148) ausführlich berichtet. Nach diesen Ergebnissen ist eine der nicht identifizierten Substanzen X das N-Alkyl-2(2-hydroxyacetyl)pyrrol 67.

Wesentlich interessanter erschien hingegen die Frage, welche Substanzen aufgrund ihrer Polarität nur nach Derivatisierung gaschromatographisch erfassbar sind. Erste Untersuchungen dazu wurden bereits von Severin und Hiebl durchgeführt, die vor allem die Bildung von Zuckerspaltprodukten nachweisen konnten (27, 149). Betrachtet man nun das Chromatogramm in Abbildung 14, so fällt auf, dass in der Nähe der noch unumgesetzten Glucose zwei Substanzen 70 und 1 detektiert werden. Diese beiden Verbindungen werden nur unvollständig durch das organische Lösungsmittel extrahiert und finden sich als Hauptprodukte der wässrigen Phase (Abb. 15).

Die Retentionszeit der Verbindung 70 war dabei von der Art des verwendeten Amins unabhängig, während der Peak 1 beim Einsatz von Propylamin anstelle von Methylamin als Reaktionspartner der Glucose erst mit späterer Retentionszeit detektiert wird. Dies stützte die Vermutung, es könnte

Abbildung 15

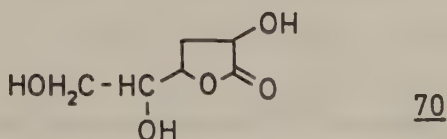


sich bei der Verbindung 1 um das Glycosylamin oder das Amadoriprodukt der Glucose handeln. Tatsächlich zeigte die Synthese der Vergleichsverbindungen, dass es sich bei diesem Peak um das Amadoriprodukt, die 1-Alkylamino-1-Desoxyfructose 1 handelt.

Ein Vergleich mit den Retentionszeiten der Anhydrozucker zeigte, dass diese selbst nach höherem, trockenem Erhitzen von Glucose unter Maillard-Bedingungen im Neutralen nicht nachweisbar waren. Von Interesse ist in diesem Zusammenhang die Arbeit von Goodwin (150), der zeigen konnte, dass Anhydrozucker beim Erhitzen von Galaktosyl- bzw.

Glucosylisomaltol mit Triethylamin/Pyrrolidin im Alkalischen gebildet werden können.

Die Identifizierung des noch unaufgeklärten Peaks gelang schliesslich Beck und Ledl (151). Sie isolierten die Verbindung aus vergleichbaren Modellgemischen und konnten anhand der Spektren das Lacton der D-Glucometasaccharinsäure 70 als Struktur zuordnen.



Diese Verbindung wurde bereits 1978 von Olsson, Pernemalm und Theander als Produkt der Reaktion von Glucose mit Glycin nachgewiesen (107). 1960 konnten Machell und Richards (152) zeigen, dass die 3-Desoxyhexosulose 2 ein Zwischenprodukt der Bildung von Metasaccharinsäuren aus Zuckern darstellt, das im Sinne einer intramolekularen Cannizaro-Reaktion zur α -Hydroxycarbonsäure reagieren kann.

5.4. Abschliessende Betrachtungen

Bei der Beurteilung der einzelnen Zuckerumwandlungsprodukte gilt es, verschiedene Faktoren zu berücksichtigen. So muss die Bedeutung einer gut bestimmbar, flüchtigen Substanz in Relation zum gesamten Reaktionsgemisch gesehen werden. Andererseits können zahlreiche polare Verbindungen in vergleichsweise hoher Konzentration vorliegen, aber eventuell nur mit grossem experimentellen Aufwand nachgewiesen werden. Schliesslich entzieht sich der grösste Teil der Produkte noch immer in Form hochmolekularer Pigmente der strukturaufklärenden Analytik.

Es ist offensichtlich, dass die Konzentration und damit auch die Bedeutung der einzelnen Verbindungen stark von den Verhältnissen im Lebensmittel abhängig ist. Je nach Art und Konzentration der Zucker, der Amine, aber auch äusseren Einflüssen wie Wassergehalt, Erhitzungsgrad oder -dauer wird die Bildung der einen oder anderen Komponente besonders gefördert.

Zu den Produkten, die in den meisten Bräunungsgemischen wie auch Lebensmitteln in grösseren Konzentrationen nachgewiesen werden können, zählen hinter den mengenmässig bedeutenden Amadoriverbindungen 1 vor allem das Dihydro- γ -pyron 7 sowie das Hydroxymethylfurfural 41. Stickstoffhaltige Verbindungen, wie die 1-Alkyl-2-formyl-5-hydroxymethylpyrrole 48 und die 3-Oxypyridiniumbetaine 49 sind im Lebensmittel ans Eiweiss gebunden. Sie sollten sich aber mit geeigneten Methoden ebenfalls nachweisen lassen.

Bei Umsetzungen von Disacchariden treten Verbindungen wie das Maltol 5, Isomaltol 8 und das γ -Pyron 7 mit in den Vordergrund. Sekundäre Amine bilden bevorzugt Aminoreduktone des Typs 35. Welche Bedeutung die Lactone der Metasaccharinsäuren 71 oder auch Anhydrozucker haben, wird noch zu klären sein.

Aber nicht nur die Konzentration eines Produktes entscheidet über seine Bedeutung. So können zahlreiche Komponenten auch in äusserst geringer Menge noch entscheidenden Einfluss auf das Aroma eines Lebensmittels nehmen. Als Beispiel dafür seien die schwefelhaltigen Acetylformoinabkömmlinge 22-25 mit ihrem äusserst intensiven, schinken- bis zwiebelartigen Geruch, sowie die Cyclopent [b]azepinderivate 16 genannt, die für den Bittergeschmack mancher Biere verantwortlich gemacht werden.

Verbindungen wie das Acetylformoin 20, ebenfalls eine aromaaktive Substanz, können noch aus anderen Gründen von grosser Bedeutung im Verlauf der Maillard-Reaktion sein. So ist Acetylformoin zwar in den meisten Fällen nur in geringen Konzentrationen nachweisbar, aufgrund seiner Reaktivität und bekannter Folgeprodukte kann man aber annehmen, dass es eine wichtige Zwischenstufe des Zuckerabbaus darstellt.

C. Zusammenfassung

Beim Erhitzen und Lagern von Lebensmitteln reagieren Zucker mit Aminen. Die dabei entstehende Vielzahl von Verbindungen ist für positive aber auch negative Eigenschaften von Lebensmitteln verantwortlich. Die grosse Bedeutung der Maillard-Reaktion liegt vor allem in der Bildung von natürlichen, meist erst bei der Zubereitung entstehenden Aroma- und Pigmentstoffen. Als unerwünschte Begleiterscheinung können allerdings auch Fehl aromen oder sogar toxikologisch nicht unbedenkliche Stoffe entstehen.

Während die Strukturen der polymeren Bräunungsprodukte noch weitgehend unbekannt sind, hat man heute bereits einige Kenntnisse über Vorstufen und Verlauf der ersten Schritte der, auch "nichtenzymatische Bräunung" genannten Reaktion. Besonders intensiv wurden in den vergangenen Jahren die flüchtigen Aromastoffe mit Hilfe der GC/MS-Kopplung untersucht.

Bei der Reaktion von Aldosen mit Aminen kommt es zur Bildung der sogenannten Amadoriprodukte 1. Diese können unter Abspaltung von Wasser bzw. des Amins in 1-, 3- oder 4-Desoxydiketozucker 2-4 übergehen. Je nach Ort der irreversiblen Abspaltung wird für das Zuckermolekül ein Abbauweg vorgegeben, der zur Bildung charakteristischer Verbindungen führt.

Schwerpunkt dieser Arbeit war es, bereits bekannte Zwischenprodukte der einzelnen Abbauewege in Modellsystemen mit Aminen umzusetzen, um weitergehende Vorstellungen von ihrer Reaktivität sowie von bislang noch unbekannten Folgeprodukten zu bekommen. Das Augenmerk richtete sich dabei weniger auf flüchtige Verbindungen, als vielmehr auf die Bildung polarer, gaschromatographisch nicht erfassbarer Substanzen.

Als wichtige Vertreter dieser Gruppe gelang es, 1-Alkyl-6-hydroxymethyl-3-oxypyridiniumbetaine 49a und 49c als charakteristische Produkte des 3-Desoxyabbaueweges von Hexosen zu isolieren, strukturell aufzuklären sowie ihre Bildungsweise und Reaktivität zu untersuchen. Auch aus Pentosen entstehen entsprechende 1-Alkyl-3-oxypyridiniumbetaine 49b. Zum Nachweis der Verbindungen wurden verschiedene Verfahren entwickelt. So lassen sie sich hochdruckflüssigkeitschromatographisch wie auch, nach katalytischer Hydrierung, gaschromatographisch bestimmen. Die Methode der Wahl zum Nachweis in Lebensmitteln wird vermutlich die Chromatographie an Ionenaustauschern sein. Die Konzentration der Betaine in Lebensmitteln ist sicher gering, aber vermutlich mit der, anderer bekannter, flüchtiger Umwandlungsprodukte vergleichbar.

Im Rahmen der Untersuchungen zum Abbau von Zuckern über die 4-Desoxyhexodiulose 4 wurde ein isomeres 1-Alkyl-2-hydroxymethyl-3-oxypyridiniumbetain 49f aus Hydroxyacetyl-furan hergestellt. Insgesamt scheint jedoch die Bedeutung dieses Abbauweges geringer. Ob Produkte des 4-Desoxyabbauweges eventuell bei der Pigmentbildung eine entscheidende Rolle spielen, bedarf noch weiterer Untersuchungen.

Im Vergleich zu den beiden anderen untersuchten Möglichkeiten des Zuckerabbaus ist die Vielfalt der über die 1-Desoxy-2,3-hexodiulose gebildeten bekannten niedermolekularen Verbindungen wesentlich grösser. Jedoch entstehen auch hier nur wenige Verbindungen, wie z.B. das Dihydro- γ -pyron 7 und das Acetylformoin 20 bei Monosacchariden oder das Maltol 5 bzw. Isomaltol 9 bei Disacchariden in vergleichsweise höheren Konzentrationen.

Aus dem Produktgemisch einer Umsetzung von Disacchariden mit N⁻-Acetyllysin wurde ein, dem Maltol analoges Pyridon 8d isoliert. Verbindungen dieser Art könnten Grund für Unstimmigkeiten bei der Routinebestimmung des Ausmasses der Lysinschädigung von Eiweiss mit Hilfe des sogenannten "Pyridosinwertes" sein.

Umsetzungen der Monosaccharidprodukte 7 und 20 führten zur Isolierung mehrerer neuer flüchtiger, aromaaktiver Zuckerumwandlungsstoffe. So weisen die Cyclopent[b]azepinderivate, von denen 16a erstmals beschrieben werden konnte, einen ausgeprägten Bittergeschmack auf, während die aus 20 dargestellten Dihydrothiophenone 22 und 24 sowie das Mercaptodihydrofuranon 25 einen intensiven, schinken- bis zwiebelartigen Geruchseindruck hinterlassen.

EXPERIMENTELLER TEIL

I. Allgemeine Angaben

1. Schichtchromatographie

DC-Alufolien, beschichtet mit Kieselgel 60F₂₅₄ ,
Schichtdicke 0.2 mm (Merck)

PSC-Fertigplatten, beschichtet mit Kieselgel 60F₂₅₄ ,
Schichtdicke 0.5 mm (Merck)

PSC-Fertigplatten, beschichtet mit Kieselgel 60F₂₅₄ ,
Schichtdicke 2.0 mm (Merck)

2. Säulenchromatographie

Kieselgel, Silica-Woelm TSC Aktivität III

3. Niederdrucksäulenchromatographie

Merck Fertigsäulen "Lobar" Grösse B

Trennmaterialien: Kieselgel 60, Lichroprep RP 18

(40-63 μ m)

4. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Semipräparative Stahlsäulen (Bischoff, Waters) gefüllt mit:

Lichrosorb Si 60 ($7\mu\text{m}$) (Merck)

μ -Porasil (Waters)

Lichrosorb RP 18 ($7\mu\text{m}$) (Merck)

Bondapack C 18 (Waters)

Geräte:

- Pumpen: Waters M 45, Waters 6000 A, Knauer 64
- Injektionssystem: Waters U 6K
- UV-Detektor mit variabler Wellenlänge: Waters Mod.450
- Refraktionsindexdetektor: Bischoff 8100

5. Gaschromatographie

Apparat A: Hewlett Packard 5830 A Gas Chromatograph

FID, für gepackte Säulen:

Säule A: SE 52, 5m

Säule B: OV 210, 3m

Apparat B: Varian Aerograph Series 2800, WLD

für gepackte Säulen

Apparat C: Perkin-Elmer 8320 Capillary Gas Chromatograph, FID für Kapilarsäulen:

30 m Permaphase DMS 0.3 m, I.D.: 0.23 mm)

Split 1 : 100

6. GC/MS-Kopplung

Varian Aerograph Series 2800 gekoppelt mit Massenspektrometer Varian MAT CH 7; Ionenquelle: 230°C, gemessen bei 70 eV.

7. Massenspektrometer

Varian MAT CH 7 Mass-Spektrometer (70 eV, Ionenquelle: 230°C)

8. IR-Spektroskopie

Perkin-Elmer 257 Grating Infrared Spektrophotometer

9. UV-Spektroskopie

Beckmann Spektrophotometer 25

10. ^1H -NMR-Spektroskopie

Varian T60 (60Hz)

Varian EM 360 A (60Hz)

Bruker WP 80 (80Hz)

Lösungsmittel: D_2O , CD_3OD , bzw. CDCl_3 mit TMS als
inneren Standard ($\delta = 0.00$ ppm)

11. ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Bruker WP 80

12. Schmelzpunkte (unkorrigiert)

Mikroheiztisch, Fa. L. Hormuth, Heidelberg

13. Siedepunkte (unkorrigiert)

Hochvakuum-Kurzwegdestillation im Luftbad gemessen

14. Extraktionen

Wurden mit flüssig/flüssig-Extraktoren kontinuierlich
durchgeführt.

II. Spezielle Arbeitsmethoden

=====

1. Untersuchungen zum 1-Desoxyabbauweg

1.1. Ausgangs- und Vergleichssubstanzen:

Maltol 5 (3-Hydroxy-2-methyl-4-pyranon):

Verwendet wurde kommerziell erhältlichches Maltol
(Fluka).

2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-5-methyl-4-pyranon 7:

Die Verbindung wurde nach Literaturangaben (153) hergestellt.

Isomaltol 9 (2-Acetyl-3-hydroxyfuran):

Isomaltol wurde ebenfalls nach Literaturangaben (154) synthetisiert.

Pyridosin 11 (2-Amino-6-(1,4-dihydro-3-hydroxy-6-methyl-4-oxo-1-pyridinyl)hexansäure):

3-Hydroxy-6-methyl-4-pyranon (Allomaltol) wurde nach Literaturangaben (155, 156) hergestellt. Zur Herstellung des Pyridosins 2.5 g Allomaltol mit 3g N^α-Acetyllysine in 30 ml Wasser lösen, 10 ml 2-N NaOH zugeben und 24 h bei 120°C im Bombenrohr unter Rühren

autoklavieren. Über eine Kieselgelsäule (I.D. 3 cm) reinigen (Elution mit Essigsäureethylester auf Methanol übergehend). Die Spektraldaten der Verbindung stimmen mit den in der Literatur angegebenen Daten (49) überein.

N^α-Acetyllysin 12:

Die Synthese erfolgte leicht modifiziert nach Literaturangaben (53-55):

1. ε-N-Carbobenzoxyl-L-Lysin (Kupferkomplex):

1.8 g L-Lysinmonohydrochlorid in 10 ml Wasser lösen und zum Kochen bringen. 5 g CuCO₃ zugeben (portionsweise unter Rühren), abkühlen lassen, filtrieren und unter Eiskühlung 5 ml 2N-NaOH zugeben (pH 8-9). 2 ml Carbobenzoxylchlorid und 10 ml 2N-NaOH in 10 Portionen innerhalb 30 min zugeben. Das blaue Präzipitat filtrieren und mit Wasser / Ethanol waschen.

2. Abtrennung des Kupfers:

4.8 g Cu-Komplex (fein zerrieben) in 30 ml Wasser lösen, bei 60°C unter starken Rühren 5.5 g EDTA in mehreren Portionen innerhalb einer 1/2 h zugeben und nach einer letzten Zugabe von 4.3 g EDTA in 20 ml Aceton abkühlen lassen. Präzipitat mehrmals mit Wasser waschen und aus Wasser umkristallisieren (Smp. 245°C)

3. Acetylierung:

2.2 g ξ -Carbobenzoxylisin in 10 ml 1N-NaOH lösen und unter Eiskühlung 1.5 ml Acetanhydrid in 20 ml 1N-NaOH in 10 Portionen innerhalb 30 min zugeben. 20 min bei Raumtemp. stehenlassen und nach dem Neutralisieren mit Salzsäure zweimal mit je 50 ml Ether ausschütteln. Die Etherphase verwerfen und die wässrige Phase ansäuern (Kongorot). Das sich ölig abscheidende α -Acetyl- ξ -carbobenzoxylisin mit Essigsäureethylester ausschütteln (3 x 50 ml), trocknen, und das Lösungsmittel im Vakuum entfernen.

4. Hydrogenolyse:

10 g α -Acetyl- ξ -carbobenzoxylisin in 200 ml unvergällten Ethanol lösen, 1 g Palladium-Mohr zugeben und unter Rühren Wasserstoff einleiten. Nach einigen Stunden lässt sich nach Abfiltrieren das ausgefallene N -Acetyllysin erhalten, und durch Auflösen in Wasser vom Palladium abtrennen.

Acetylformoin 20 (2,4-Dihydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon):

Die Verbindung wurde nach Literaturangaben (157) hergestellt.

Furaneol 21 (2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon):

Die Verbindung wurde uns dankenswerterweise von der Fa. Firmenich zur Verfügung gestellt.

Piperidinoamadoriprodukt (1-Desoxy-1-piperidino-fructose):

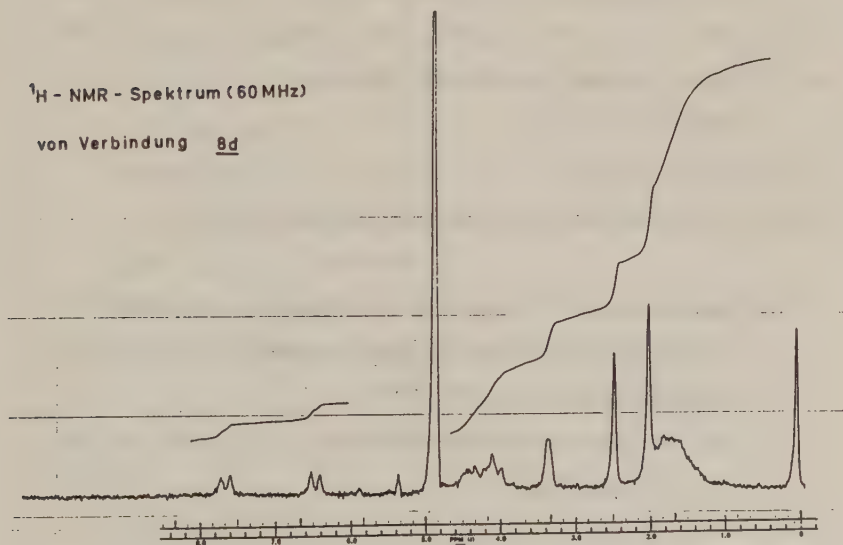
wurde nach Literaturangaben (155) hergestellt.

1.2. Herstellung von Acetylmaltosin 8d (2-Acetamido-6-(1,4-dihydro-3-hydroxy-2-methyl-4-oxo-1-pyridinyl)hexansäure):

5g N -Acetyllysin 12 zusammen mit 3 g Isomaltol 9 in 60 ml Wasser lösen. 20 h am Rückfluss erhitzen und nicht umgesetztes Isomaltol 7h mit Methylenchlorid extrahieren. Die Isolierung des Acetylmaltosins gelingt durch anschließende, ca. 9-stündige Extraktion mit Essigsäureethylester.

^1H - NMR - Spektrum (60 MHz)

von Verbindung 8d



Der Rückstand der organischen Phase wird in wenig Methanol gelöst, ungelöstes N^{ac}-Acetyllysin abfiltriert und das Pyridon über eine Kieselgelsäule gereinigt (Elution mit Essigsäureethylester auf Methanol übergehend). Die Fraktionen werden dünnschichtchromatographisch untersucht (Rf 0.3 in Essigsäureethylester/Methanol 7:3; Blaufärbung mit Eisen(III)chlorid-Lösung). Nach Entfernen des Elutionsmittels erhält man die Verbindung 8d.

8d: Hellgelbes Öl, hygroskopisch, nicht destillierbar
¹H-NMR (CD₃OD): ppm 1.2-2.3 (m, 6H), 2.04 (s, 3H), 2.51 (s, 3H), 3.7-4.8 (m, 3H), 6.53 (d, 1H, J = 7Hz), 7.73 (d, 1H, J = 7Hz). - MS: 296 (23, M⁺), 278 (70), 207 (92), 180 (80), 166 (60), 164 (32), 152 (58), 126 (53), 125 (100), 96 (81), 84 (67). - IR(KBr): 3280, 2950, 1720, 1650, 1630, 1550, 1500, 1370, 1260, 1220, 1040, 830 cm⁻¹. - UV. (CH₃OH): λ_{max} = 297nm (lgε = 3.55), 255 nm (lgε = 3.17).

1.3. Nachweis von 8c am Aminosäureanalysator:

Die Analysen wurden dankenswerterweise von Herrn Dr. Wieser an der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie durchgeführt.

Die genauen Analysenbedingungen sind auf Seite 124 (2.7.) aufgeführt.

Maltosin 8c wird mit der selben Retentionszeit wie Pyridosin 11 eluiert (490 ± 2) und zwar vor Histidin (529 ± 2) und Lysin (542 ± 2) sowie nach Phenylalanin (405 ± 2). Auf Seite 64 ist ein entsprechendes Chromatogramm abgebildet.

1.4. Isolierung von 8d aus Umsetzungen von Disacchariden mit N^α-Acetyllysin:

5 g Zucker (Maltose, Lactose) und 2g N^α-Acetyllysin in 50 ml Phosphatpuffer (pH 7) lösen und 5-10 ml Ethanol (bis zur Löslichkeitsgrenze des Phosphats) zugeben. Nach 24-stündigem Erhitzen am Rückfluss den Puffer durch Methanolzugabe weitgehend ausfällen, filtrieren und die Lösung am Vakuum einengen. Den Rückstand über eine Kieselgelsäule (I.D. 5 cm; Elution mit Methanol/Essigsäureethylester 1:1 auf Methanol übergehend) auftrennen und die entsprechenden Fraktionen (DC-Kontrolle) über eine Niederdrucksäule (Kieselgel, Elution mit Methanol/Essigester 1:1) weiter reinigen. Ausbeute 0.5%

Die Spektraldaten stimmen mit denen der aus Isomaltol hergestellten Verbindung überein.

1.5. Herstellung von 8e (2-Acetamido-6-(1,4-dihydro-3-hydroxy-2-methyl-4-oxo-1-pyridinyl)hexansäuremethylester):

8d in 2N-methanolischer Salzsäure 2 h kochen. Dünnschichtchromatographisch reinigen (2 mm, Laufmittel: Essigsäureethylester/Methanol 7:3, Rf: 0.45)

8e: Hellgelbes Öl, hygroskopisch, Siedebereich 210-230°C / 0.1 Torr. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): ppm 1.1-2.2 (m, 6H) 2.06 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 3.6-4.2(m, 3H), 3.8 (s, 3H), 4.4-5.0 (s breit, O-H, N-H), 6.47 (d, 1H, J = 7Hz), 7,34 (d, 1H, J = 7Hz). - MS: 310 (32, M), 279 (29), 180 (100), 152 (62), 126 (56), 125 (65), 84 (95). - IR(KBr): 3250, 2950, 1750, 1670, 1640, 1580, 1520. 1380, 1260, 1040, 840 cm^{-1} .

1.6. Umsetzung von 8d mit Diazomethan:

8d in Methanol lösen, Diazomethan in Ether zugeben und über Nacht stehen lassen. Nach Entfernen des Alkylierungs- und des Lösungsmittels erhält man ein:

hellgelbes Öl, nicht destillierbar

$^1\text{H-NMR}$: Spektraldaten nicht interpretierbar

- MS: 324 (100, M^+), 310 (32), 309 (28), 265 (56), 223 (72), 194 (92).

1.7. Isolierung der Verbindungen 16a (7-Hydroxy-7-methyl-2,3,6,7-tetrahydrocyclopent [b] azepin-8(1H)-on) und 16b (7-methyl-2,3,6,7-tetrahydrocyclopent [b] azepin-8(1H)-on):

4.5 g Dihydroxypyranon 7 mit 9 g Prolin in 200 ml Ethanol 8 h unter Rückfluss erhitzen, nach dem Erkalten ausgefallenes Prolin abtrennen, den Alkohol unter verminderten Druck weitgehend entziehen und den verbliebenen Rückstand mit Wasser aufnehmen. Nach 2-stündiger Methylenchlorid-Extraktion die wässrige Lösung 4 h mit Essigester extrahieren und den Rückstand der organischen Phase über präp. Kieselgelplatten (2 mm) mit den Fließmittelgemisch Essigester / Toluol 1:1 auftrennen. Aus der Zone mit dem Rf-Wert 0.8 kann Verbindung 16b und aus der Zone mit dem Rf-Wert 0.45 Verbindung 16a mit Methanol eluiert werden.

16a: Hellgelbe Kristalle, Schmp. 120°C, Ausbeute 5%.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): ppm 1.36 (s, 3H), 2.58 (d, 1H, J = 16.3Hz), 2.62 (m, 2H), 2.70 (d, 1H, J = 16.3 Hz), 3.09 (s, 1H, OH), 3.22 (m, 1H), 3.34 (m, 1H), 4.58 (s, 1H, NH), 5.96 (dt, 1H, J = 11.2, 1.7Hz), 6.11 (dt, 1H, J = 11.2, 5.8Hz); - MS: 179 (73, M⁺), 136 (16), 108 (100), 79 (19), 77 (17), 43 (42). - UV (CH₃OH): λ_{max} = 370 nm (lg ε = 4.03). - IR(KBr): 3500, 1675, 1635, 1590, 1510, 1120, 965, 890, 770 cm⁻¹.

¹³C-NMR (CDCl₃): ppm 25.6 q, 34.9 t, 43.07 t, 73.9 s, 126.3 d, 130.7 s, 136.9 d, 139.5 s, 203.5 s.

16b: Hellgelbes Öl, Sdp. 50-60°C/0.1 Torr, Ausbeute 2%
¹H-NMR (CDCl₃): ppm 1.28 (d, 3H, J = 7Hz), 1.98-3.08 (m, 5H), 3.31 (m, 2H), 4.58 (s, 1H, NH), 6.12 (m, 2H)
- MS: 163 (80, M⁺), 162 (100), 148 (19), 120 (21), 106 (15), 93 (15), 91 (12), 79 (20), 77 (20), 65 (19)
- UV (CH₃OH): λ_{max} = 360 nm (lg ϵ = 3.3).

1.8. Reduktion von 16a zu 16b:

100 mg 16a in 5 ml Eisessig lösen, Zinnstaub und Zinnplättchen im Überschuss zugeben und 85 min auf 100°C erhitzen. 16b dünnschichtchromatographisch reinigen (s.o.). Ausbeute 85%. Spektraldaten siehe unter 1.7.

Die Reduktion wurde kapillargaschromatographisch verfolgt:

Apparat C, Methode 1:

Temp. 1: 60°C, Time 1: 2 min, Rate 5°C/min

Temp. 2: 210°C, Time 2: 10 min

Inj. 260°C, Det. 260°C.

Retentionszeit: 16a: 26.6 min ($\pm$ 0.2)

16b: 24.7 min ($\pm$ 0.2)

1.9. Isolierung von 17a (2,5-Dihydroxy-3-(2-carboxy-1-pyrrolidinyl)-5-methyl-2-cyclopenten-1-on) aus einem Umsetzungsgemisch von Acetylformoin 20 mit Prolin:

Je 1 g Acetylformoin 20 und Prolin in 30 - 50 ml Ethanol lösen und 90 min unter Rückfluss erhitzen. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum den Rückstand in Wasser lösen und 60 min mit Essigester extrahieren. Den Rückstand der wässrigen Phase schichtchromatographisch (2 mm) reinigen (Laufmittel: Methanol/Essigester 1:1; Rf: 0.4). Die Spektraldaten nach Bismethylierung mit Diazomethan stimmen mit den in der Literatur (68) angegebenen Daten überein.

1.10. Herstellung von 22 (4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-thiophenon) aus Acetylformoin 20:

1 g Acetylformoin 20 in 20-30 ml Methylenchlorid lösen und 1 g Phosphorpentasulfid zugeben. Im Ultraschallbad suspendieren und zur Trockne eindampfen. 50 ml CH_2Cl_2 zugeben und unter Ultraschall über Nacht am Rückfluss halten. Die überstehende Lösung filtrieren, das Lösungsmittel entfernen und den Rückstand am Hochvakuum bis 100°C destillieren. Über GC/MS-Kopplung kann 22 anhand seines Massenspektrums (70, 71) als Hauptprodukt der Umsetzung nachgewiesen werden (gaschromatographische Bedingungen siehe 1.11.). Die Reinigung erfolgt schichtchromatographisch (2 mm, Laufmittel: Toluol/Essigester 1:1; Rf: 0.6).

- 1.11. Nachweis von Verbindung 22 in einem Umsetzungsgemisch von Cystein mit dem Piperidino-Amadoriprodukt (1-Desoxy-1-piperidino-fructose):

6g Piperidino-Amadoriprodukt zusammen mit 8.5 g Cystein in 50 ml Wasser lösen und 3 h bei 150°C autoklavieren. Nach dem Abkühlen 2 h mit Methylenchlorid extrahieren und den Rückstand der organischen Phase am Hochvakuum bis 120°C destillieren. Das übergegangene Öl gaschromatographisch mit MS-Kopplung untersuchen: Apparat C, Programm: 80-280°C, 5°C/min, Inj.: 280°C, Det.: 280°C. Retentionszeit von 22: c.a. 17min

- 1.12. Herstellung von 24 (2,4-Dihydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-thiophenon):

720 mg Acetylformoin zusammen mit 880 mg Cystin und 100 mg Cystein in 60 ml Wasser lösen und 1 h bei 140°C unter Rühren im Bombenrohr autoklavieren. Nach dem Abkühlen die wässrige Lösung 1 h mit Methylenchlorid extrahieren. Den Rückstand der organischen Phase dünnschichtchromatographisch auftrennen (0.5mm, Laufmittel: Essigester/Toluol 1:1). Aus der UV-löschenden Zone (Rf: 0.45) 24 mit Methanol eluieren und am Hochvakuum destillieren.

24: Schwachgelbe Kristalle, sublimierbar bei 96°C/
0.1 Torr, Schmp. 115-119°C. In der Literatur (71) ist
die Verbindung als Öl beschrieben. Die Spektraldaten
stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.
Die Substanz besitzt ein angenehm schinken- bis zwie-
belartiges Aroma.

- 1.13. Isolierung von 26 (4,4'-Dithio-bis-(2,5-dimethyl-3-
(2H)-furanon) und Nachweis von 25 (2,5-Dimethyl-4-mer-
capto-3 (2H)-furanon):

500 mg Furaneol 21 zusammen mit 400 mg "Lawesson's
Reagenz" in 10 ml CH_2Cl_2 lösen und 60 min unter
leichtem Rückfluss erhitzen. Dünnschichtchromatogra-
phisch reinigen (0.5 mm, Laufmittel: Ester/Toluol
1:1, Rf von 26 0.4, Rf von 25 0.7).

26: Hellgelbes Öl, nicht destillierbar, Ausbeute 20%.
 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): ppm 1.50 (d, 6H, J = 7Hz), 2.43 (s,
6H), 4.65 (q, 2H, J = 7Hz). - MS: 286 (100, M^+), 144
(77), 143 (83), 115 (47), 102 (35), 101 (32).

25: Hellgelbes Öl. - MS: 144 (46, M^+), 101 (81), 87
(25), 43 (100).

1.14. Anreicherung von 29 (2,5-Dimethyl-4-hydroxy-4-pyrrolin-3-on) aus einer Umsetzung von Acetylformoin mit Glycin:

215 mg Glycin zusammen mit 265 mg Acetylformoin 20 in 5-10 ml Wasser lösen. Mehrmals ca. 20-30 min zum Sieden (Rückfluss) erhitzen, wobei die Lösung zwischen den einzelnen Erhitzungsvorgängen 1-3 h abkühlen sollte. Anschliessend unter Methanolzugabe im Vakuum zur Trockne eindampfen und am Hochvakuum destillieren. Die Destillationsbrücke bei 120°C wechseln und bis 150°C weiter destillieren. Das blassgelbe Öl in Methanol lösen - kristallines Diketopiperazin 30 bleibt ungelöst. Den Methanolextrakt mehrerer Ansätze vereinigen. Durch wiederholte Destillation lässt sich die Verbindung anreichern, so dass das auf Seite 40 abgebildete NMR-Spektrum erläutert werden kann. So sind die Signale bei 1.30 und 1.43 ppm, sowie bei 2.56 ppm mit ziemlicher Sicherheit auf eine schon bei 120°C/0.1 Torr destillierbare Verunreinigung zurückzuführen. Die Überprüfung der Destillationsfraktionen erfolgte massenspektrometrisch. Die Verbindung lässt sich weder gaschromatographisch nachweisen, noch dünnschichtchromatographisch reinigen.

29: Blassgelbes Öl, Siedebereich 130-150°C/0.1 Torr
- MS: 127 (100, M⁺), 126 (73), 98 (57), 85 (32), 71 (52), 69 (62), 56 (89), 55 (70).

1.15. Herstellung der Verbindungen 32 (1-Methoxy-5-dimethylhydrazono-2,4-hexandion) und 34 (3-Methoxy-5-dimethylhydrazono-2,4-hexandion):

8.7 g (0.1 Mol) Methoxyaceton (über P₂O₅ getrocknet) und 8.5 g (0.05 Mol) trockenes Brenztraubensäure-ethylesterdimethylhydrazon 31 (76) in eine gekühlte Lösung von 0.1 Mol Na-Alkoholat in Ethanol unter Ausschluss von Feuchtigkeit geben und über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Die Lösung mit Eisessig neutralisieren und mehrfach ausethern. Den Rückstand der organischen Phase am Hochvakuum fraktioniert destillieren. Die Fraktion von 85-110°C schichtchromatographisch reinigen (0.5 mm, Laufmittel: Essigester/Toluol 1:1, Rf für 32: 0.6, für 34: 0.7).

32: Gelbes Öl, Siedebereich 80-120°C/0.1 Torr
- MS: 200 (81, M⁺), 169 (35), 155 (86), 141 (52), 113 (73), 85 (100).

34: Gelbes Öl, Siedebereich 80-120°C/0.1 Torr
- MS: 200 (41, M⁺), 157 (100), 113 (55), 97 (63), 85 (85).

1.16. Herstellung von 33 (5-Dimethylhydrazono-2,4-hexandion):

0.1 Mol trockenes Aceton mit 0.05 Mol 31 nach Vorschrift 1.16 umsetzen und reinigen (Rf: 0.7).

33: Gelbes Öl, Siedebereich 80-100°C/0.1 Torr

¹H-NMR (CDCl₃): ppm 1.83 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 2.42 (s, 6H), 5.41 (s, 1H). - MS: 170 (40, M⁺), 127 (32), 85 (82), 60 (100).

1.17. Versuch der Cyclisierung von 32, 33 und 34 mit Natriumdithionit:

Die Reduktion mit Dithionit erfolgte nach Literaturangaben (76, S. 80).

1.18. Dünnschichtchromatographischer Nachweis von 39 (2-Hydroxy-3-(1-pyrrolidiny1)-5-methyl-2-cyclopenten-3-on) in einem Acetylformoin/Prolin-Reaktionsgemisch:

2.5g Acetylformoin mit 3.0g Prolin in einer Mischung von je 25 ml Ethanol und Wasser lösen und im Bombenrohr 120 min auf 140°C erhitzen. Nach dem Abkühlen 60 min mit Essigester extrahieren und den Rückstand der organischen Phase am Hochvakuum destillieren.

In der von 120-200°C destillierenden Fraktion ist 39 mit Hilfe einer Vergleichssubstanz dünn-schichtchromatographisch nachweisbar (Laufmittel: Essigester/Toluol 1:1, Rf: 0.35, Detektion mit alkalischer TTC-Lösung (Rotfärbung) oder methanolischer FeCl₃-Lösung (kurze Blaufärbung)). Die Vergleichssubstanz lässt sich durch Erhitzen von 17a auf ca. 150°C herstellen und im Hochvakuum (0.1 Torr) sublimieren. Die Spektral-daten sind der Literatur (68) zu entnehmen.

- 1.19. Isolierung und Nachweis von 40 (5-Acetyl-6-methyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolizin) in erhitzten Mischungen von Prolin und Acetylformoin:

Acetylformoin mit Prolin nach Vorschrift 1.18 umsetzen. Nach dem Abkühlen 7 h mit Methylenchlorid extrahieren und den Rückstand der organischen Phase schichtchromatographisch reinigen (0.5 mm, Laufmittel: Essigester/Toluol 1:1, Rf: 0.75, Detektion mit Dimethylaminobenzaldehyd in 1N-HCl möglich). Das durch Elution der entsprechenden Zonen erhältliche Öl am Hochvakuum destillieren. Beim Erhitzen scheiden sich zwischen 30 und 70°C an der Destillationsbrücke Kristalle ab. Die Verbindung lässt sich gut kapillargaschromatographisch nachweisen (Apparat C, Methode 1 siehe 1.8., Retentionszeit 24.7 min).

40: Farblose Kristalle, Schmp. 48 °C, sublimiert bei ca. 50°C/0.1 Torr; - MS- und NMR-Daten sind der Literatur zu entnehmen (82). - IR(KBr): 1700, 1620, 1600, 1440, 1405, 1380, 1290, 1080, 955, 790 cm⁻¹.

2. Untersuchungen zum 3-Desoxyabbauweg

2.1. Ausgangs- und Vergleichssubstanzen:

HMF 41 (5-Hydroxymethyl-2-furfural):

Die Verbindung wurde nach Literaturangaben (158) hergestellt.

2.2. Herstellung von Verbindung 49a (6-Hydroxymethyl-1-methylpyridinium-3-olat):

5g HMF in je 30 ml Ethanol und Wasser lösen. Nach Zugabe von 1,5g Methyllummoniumacetatlösung (40% in Wasser) mit Methylamin bzw. Eisessig auf pH 7 einstellen und über Nacht am Rückfluss erhitzen. Am Rotationsverdampfer den Alkohol entfernen und nach Verdünnen mit Wasser 4 Stunden mit Essigsäureethylester extrahieren. Den Rückstand der Wasserphase in Methanol

lösen und über eine Kieselgelsäule fraktionieren.

(I.D.: 5cm, Länge 25cm, Woelm Silica TSC. Mit dem Elutionsmittelgemisch Essigsäureethylester/ Methanol 1:1 beginnen und auf Methanol übergehen). In einer mit Methanol eluierbaren Fraktion ist 49a enthalten (DC-Kontrolle), das, falls noch nicht kristallin, schichtchromatographisch gereinigt werden kann (2mm, Laufmittel: Methanol, Rf:0,3). Ausbeute 10%.

49a: Farblose Nadeln (aus Isopropanol), hygroskopisch, Smp.: 169°C(Zers.).-¹H-NMR (CD₃OD): ppm 4,22 (s, 3H), 4,77(s. 2H), 7,2-7,9(m, 3H).-MS: 139 (100, M⁺), 123 (39), 122 (72), 111 (40), 110 (57), 94 (79). (Unter den Bedingungen der Messung wurde ein wechselnder Anteil an 5d gebildet).-IR(KBr): 1670, 1580, 1540, 1420, 1370, 1270, 1220, 1100, 860 cm⁻¹.-UV(CH₃OH): λ_{max}= 338 nm (lgε= 3,74), 258 nm (lgε = 3,99).

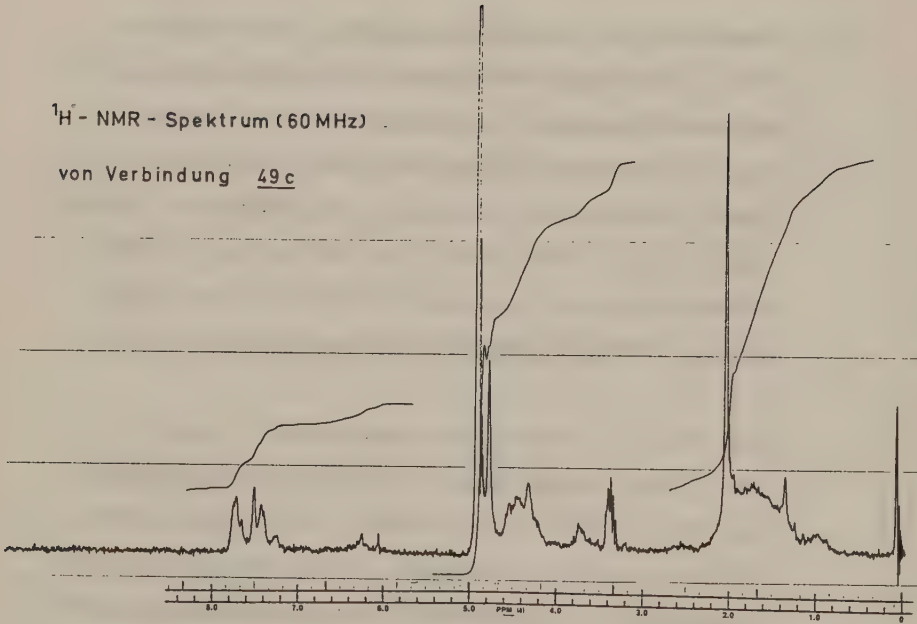
2.3. Synthese von 49b (1-Methylpyridinium-3-olat):

49b wurde nach Literaturangaben (117,118) synthetisiert. Ausbeute 10%.

49b: Farbloses Öl.-¹H-NMR (CD₃OD): ppm 4.21 (s, 3H), 7,2-4,8 (m, 4H). Die im Vergleich zur Literatur (118) leicht unterschiedlichen Verschiebungen sind auf das andere Lösungsmittel zurückzuführen. Ebenfalls

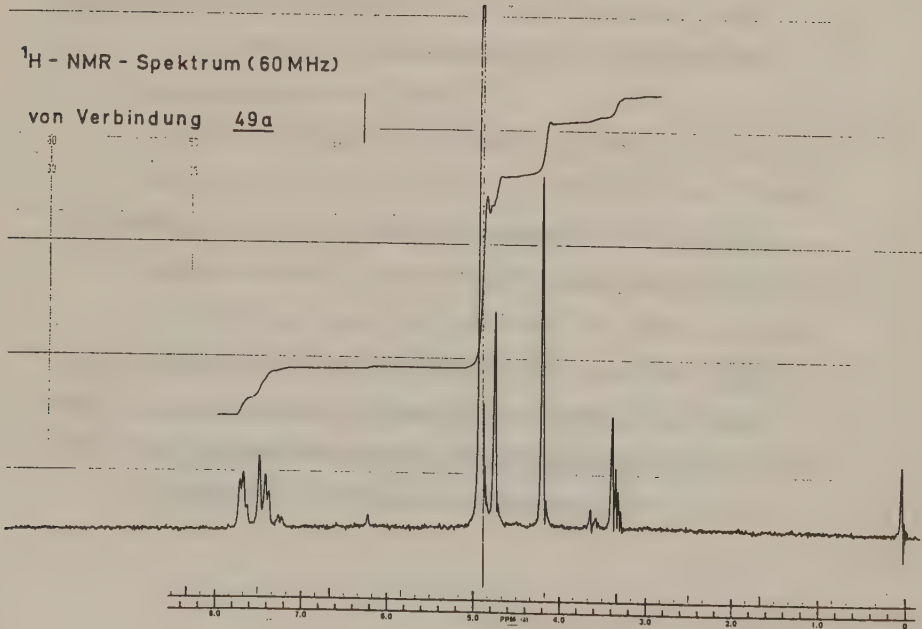
^1H - NMR - Spektrum (60 MHz)

von Verbindung 49c



^1H - NMR - Spektrum (60 MHz)

von Verbindung 49a



abweichend von Literaturangaben konnte ich ein Massenspektrum erhalten. -MS: 109 (100, M^+), 81 (80), 80 (65).

2.4. Isolierung von 49a bzw. 49b aus Umsetzungsgemischen von Zuckern mit Methylammoniumacetat:

25 g Zucker (Glucose, Xylose, Maltose) in einem Gemisch von je 150ml Ethanol und Wasser lösen und 7g Methylammoniumacetatlösung (40% in Wasser) zugeben. Den pH-Wert mit Methylamin bzw. Eisessig wie gewünscht einstellen und 50 bis 150 Stunden (Xylose 20-40 Stunden) unter Rückfluss kochen. Die Bildung der Betaine dünnschichtchromatographisch verfolgen (Laufmittel: Methanol, R_f 0,3). Nach Abziehen des Alkohols am Rotationsverdampfer die verbleibende wässrige Lösung 6 Stunden mit Essigsäureethylester extrahieren. Der wässrigen Phase weitgehend das Lösungsmittel entziehen und den Rückstand über eine Säule chromatographisch auftrennen (Kieselgel Woelm TSC, I.D. 5cm. Länge 25cm). Mit dem Elutionsmittelgemisch Methanol/Essigsäureethylester 1:1 beginnen und schnell auf Methanol übergehen. Nach dem 2-3fachen Säulenvolumen an Methanol wird in der Regel das Betain eluiert. Eventuell ist sogar eine Elution mit Methanol-Wasser Gemischen notwendig.

Zur weiteren Reinigung den Rückstand der entsprechenden Fraktionen über eine Niederdrucksäule (RP-18, Fließmittel: Methanol/Wasser 3:7 oder Kieselgel 60, Fließmittel: Methanol) auftrennen (DC-Kontrolle). Um die Betaine kristallin und sauber zu erhalten, wird noch hochdruckflüssigkeitschromatographisch getrennt und zwar hintereinander über eine semipräparative reversed-phase Säule (Elutionsmittel: Methanol/Wasser 1:9) und eine semipräparative Kieselgelsäule (Elutionsmittel Methanol/Essigsäureethylester 7:3). Die Spektraldaten stimmen mit denen der isolierten bzw. synthetisierten Verbindungen 49a und 49b überein. Die Ausbeute beträgt ca. 0.1%. Bei Xylose bereits nach 30 Stunden 0.2-0.3%. Statt der hoch- und niederdruckflüssigkeitschromatographischen Reinigung kann man 49a und 49b auch über den Kationenaustauscher Amberlite IRC -84 (H^+ -Form) anreichern. Nach Aufgabe des Rückstandes der entsprechenden Fraktionen der ersten Kieselgelsäule wird mit Wasser nachgewaschen und das Betain mit verdünnter Essigsäure eluiert. Nach dickschichtchromatographischer (Merck, Kieselgel 2mm, 60 F 254) und anschließender dünnschichtchromatographischer Reinigung (Kieselgel 0,5 mm, in Methanol Rf:0,3) liegen die Betaine in ausreichender Reinheit für die Aufnahme von Spektren vor. Nach der Schichtchromatographie muss die entsprechende UV-löschende Zone mit heissem Methanol mehrfach eluiert werden.

2.5. Herstellung von 49c (1-(5-acetamido-5-carboxypentyl)-6-hydroxymethylpyridinium-3-olat) aus HMF:

5g HMF und 1g N^{ac}-Acetyllysine in einem Gemisch von je 30ml Ethanol und Wasser lösen. Nach Zugabe von 2,5ml 2N-NaOH 7 Tage unter Rückfluss kochen. 1g Piperidiniumacetat zufügen und weitere 7 Tage erhitzen. Nach Entfernung des Alkohols die wässrige Lösung 5 Stunden mit Essigsäureethylester extrahieren. Der polaren Phase das Wasser entziehen und den Rückstand säulenchromatographisch auftrennen (Kieselgel Woelm TSC, I.D. 4cm, Länge 30cm). Bei der Elution von einem Gemisch aus Essigsäureethylester und Methanol (1:1) auf reines Methanol übergehen. Nach nochmaliger Säulenchromatographie (I.D. 2,5cm, Länge 40cm) in der beschriebenen Weise (etwas länger mit Esteranteilen eluieren) die entsprechenden Fraktionen durch präparative Schichtchromatographie reinigen (Kieselgel 2 mm Laufmittel Methanol, R_f 0,35).

49c: Farbloses Öl. - ¹H-NMR (CD₃OD): ppm 1,1-2,2 (m, 6H), 2,00 (s, 3H), 4,1-4,7 (m, 3H), 4,76 (s, 2H), 7,2-7,8 (m, 3H). -UV (CH₃OH): λ_{max} = 331nm (lg ε = 3,28), 256nm (lg ε = 3,61). -MS: Die Verbindung ergab kein auswertbares Massenspektrum.

2.6. Isolierung von 49c aus einer Umsetzung von Glucose mit N^ε-Acetyllysine:

1g N^ε-Acetyllysine und 5g Lactose in 50ml Phosphatpuffer (3g K₂HPO₄, 0,5g KH₂PO₄, pH 7) lösen und 7 Stunden bei 130°C autoklavieren. Nach dem Abkühlen Puffer durch Ethanolzugabe weitgehend ausfällen. Die Lösung am Vakuum einengen und den Rückstand nach einer Vortrennung über eine Kieselgelsäule (I.D.5cm, Länge 35cm, Elution mit Essigsäureethylester/Methanol 1:1 auf Methanol übergehend) schichtchromatographisch (Kieselgel 2mm, Laufmittel Methanol, R_f 0,35) reinigen. Die Spektraldaten stimmen mit denen der aus HMF hergestellten Verbindung überein.

2.7. Nachweis von 49d (1-(5-Amino-5-carboxypentyl)-6-hydroxymethylpyridinium-3-olat) am Aminosäureanalysator:

-Hydrolyse: 49c 24h in 6N-HCl autoklavieren (112°C).

-Aminosäureanalysator: LKB 4400

-Stahlsäule 4x295 mm, gefüllt mit Ultro Pac-8.

-Temperatur: T₁ = 45°C, T₂ = 56°C, T₃ = 73°C.

-Puffer: Na-Citrat Puffer, 0.2 mol/l, P₁ = pH 3.20, P₂ = pH 4.25, P₃ = pH 6,45 (+1.0 mol/l NaCl)

-Detektion: Ninhydrinanfärbung und Messung im Durchflussspektrometer bei 440 und 570 nm.

-Probenaufgabe: Substanz gelöst in Citratpuffer pH 2,2.

Ich danke Herrn Dr. Wieser von der deut. Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie für die Durchführung der Analysen.

2.8. Isolierung von 49e (6-Formyl-1-methyl-pyridinium-3-olat) nach Erhitzen von 49a in DMF:

49a 2 Stunden in DMF auf 150°C erhitzen. Nach Abziehen des Lösungsmittels am Vakuum (0,1 Torr) den Rückstand säulenchromatographisch fraktionieren ((Kieselgel Woelm TSC, I.D. 2.5 cm, Länge 25cm). Bei der Elution von einem Gemisch von Essigsäureethylester/Methanol 1:1 langsam auf Methanol übergehen. Die Fraktionen, in denen 49e dünnschichtchromatographisch nachweisbar ist, (Rf 0,4 auf Kieselgel in Methanol) mit Hilfe der semipräparativen HPLC weiter auftrennen (Merck-Lichrosorb. RP 18, 7 μ , Elutionsmittel Methanol/Wasser 1:9 anschliessend Lichrosorb Si 60, 7 μ , Elutionsmittel Methanol/ Essigsäureethylester 1:1). Das Lösungsmittel der entsprechenden Fraktionen (UV-Detektion) am Vakuum entfernen. Die Spektraldaten stimmen mit denen der durch Braunstein oxidierten Verbindung (s.u.) überein.

2.9. Oxidation von 49a zu 49e mit Braunstein:

200 mg 49a mit 1g frisch gefälltem Braunstein (125) in 30ml Wasser suspendieren und unter Rühren auf 100°C am Rückfluss erhitzen. Nach 2 Stunden filtrieren, einengen und den Rückstand schichtchromatographisch auftrennen (Kieselgel 2mm, Laufmittel Methanol). Aus einer Zone mit Rf 0.4 49e mit Methanol eluieren. Ausbeute 65%.

49e: Farblose Nadeln, hygroskopisch, Schmp .
167-168°C (Zers.). $^1\text{H-NMR}$: (CD_3OD)/ DCI): ppm 4,19
(s,3H), 5,88 (s,1H), 7,8-8,3(m,2H). -MS: 137(100, M^+),
109 (30), 108(92),80(43). -IR(KBr): 1670, 1580, 1540,
1420, 1370, 1270, 1220, 1100, 860 cm^{-1} . -UV (CH_3OH):
 λ_{max} = 338 nm ($\lg \epsilon$ = 3,61), 258nm ($\lg \epsilon$ = 3,64)

2.10. Isolierung einer unbekannten Verbindung mit der Molekularmasse 208 nach Erhitzen von 49a in DMF:

49a 2 h in DMF auf 150°C erhitzen. Nach Abziehen des Lösungsmittels am Vakuum (0.1 Torr) den Rückstand säulenchromatographisch fraktionieren (I.D. 2.5 cm, Länge 25 cm). Bei der Elution von einem Gemisch von Essigester/Methanol (1:1) langsam auf Methanol übergehen. Die Fraktionen, in denen die Verbindung dünn-schichtchromatographisch nachweisbar ist, (Rf : 0.5 auf Kieselgel in Methanol) mit Hilfe der semipräparativen HPLC weiter auftrennen (Merck-Lichrosorb RP 18, Elutionsmittel: Methanol/Essigester 1:1).

"208": Farbloses Öl, hygroskopisch, nicht destillierbar. $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): s. Abb. S. 67. -MS: 208 (55, M^+), 165 (85), 163 (72), 151 (100), 123 (80), 120 (50).

2.11. Isolierung von 51 (5-Hydroxymethyl-2-furfuralmethylimin):

5 g HMF 41 zusammen mit 1 g Methylammoniumacetat bei pH 7 in einer Mischung von je 25 ml Ethanol und Wasser lösen und über Nacht am Rückfluss erhitzen. Die Reaktionslösung 2h mit Essigester extrahieren und den Rückstand der organischen Phase bei 90°C im Hochvakuum destillieren.

51: Hellgelbes Öl, Siedebereich 80-90°C/0.1 Torr

¹H-NMR (CDCl₃): ppm 3.45 (d, 3H, J = 1.5Hz), 4.66 (s, 2H), 4.94 (s breit, 1H, OH), 6.37 (d, 1H, J = 3.5Hz), 6.73 (d, 1H, J = 3.5Hz), 8.05 (q, 1H, J = 1.5Hz).

-MS: 139 (35, M⁺), 86 (90), 84 (100).

2.12. Herstellung von 52 (2-Formyl-5-hydroxymethyl-1-methylpyrrol) über 53 (5-Hydroxymethyl-1-methylpyrrol-2-carboxaldehydmethylimin):

1.4 g HMF 41 zusammen mit 1.3 g Methylammoniumacetat (ca. 85% in Wasser) 10 min auf 120°C erhitzen. Die Schmelze nach dem Abkühlen fraktioniert am Hochvakuum destillieren. Bei 100-120°C destilliert 53 und kann massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

53: Blassgelbes Öl, Siedebereich 100-110°C

- MS: 152 (40, M^+), 110 (30), 94 (28), 73 (100)

Bei der dünnschichtchromatographischen Reinigung (2 mm) auf Kieselgel wird 53 zu 52 hydrolysiert.

Ausbeute an 52 aus HMF insgesamt ca. 5-10%.

Die Spektraldaten für 52 sind der Literatur (91) zu entnehmen.

2.13. Katalytische Reduktion von 49a zu 3-Hydroxy-6-hydroxymethyl-1-methylpiperidin 58:

500mg 49a in 50ml Wasser lösen und 1-2g Palladium auf Aktivkohle (5%) zugeben. 3 Stunden bei leichten Überdruck hydrieren, filtrieren und mit Wasser und Methanol nachwaschen. Die Lösungsmittel im Vakuum entfernen. Ausbeute 62%.

58: Farbloses Öl, Siedebereich 105-110°C / 0.1 Torr.

¹H-NMR (CD₃OD): ppm 1,0-2,8(m,6H), 2,34(s,3H), 2,98

(ddd,1H;J=11 Hz, 5Hz, 2Hz), 3,2-4,0(m,1H), 3,60

(dd,2H,J=5Hz,2Hz). -MS: 146 (10, $M+1$), 145(3, M^+), 144

(7), 129(25), 128(15), 115(25), 114(100), 96(61),

81(92).

Nach Acetylierung in Acetanhydrid/Pyridin erhält man das bisacetylierte Produkt:

Farbloses Öl, Siedebereich 105-110°C/0,1 Torr.

-¹H-NMR: (CD₃OD): ppm 1,2-2,8(m,6H), 2,06(s,3H), 2,10(s,3H), 2,41(s,3H), 3,11(ddd,1H,J=11Hz, 5Hz,2Hz), 4,21 (d,2H,J=5Hz), 4,55-5,2 (m,1H).-MS: 230(1,M+1), 229(2,M⁺), 228(1), 186(2), 170(25), 169(10), 157(32), 156(100), 96(81).

2.14. Reduktion von 49a zu 58 mit NaBH₄:

500 mg 49a in 10 ml Ethanol lösen und 200mg NaBH₄ zugeben. 2h bei Raumtemperatur rühren und anschliessend unter mehrfacher Methanolzugabe am Vakuum eindampfen. Den Rückstand am Hochvakuum destillieren (100-110°C/0.1 Torr) und gegebenenfalls mit Acetanhydrid/Pyridin acetylieren (siehe 2.13.).

2.15. Gaschromatographischer Nachweis von 58 in einem katalytisch hydrierten Bräunungsgemisch der Reaktion von Glucose mit Methylamin:

Glucose mit Methylamin nach Vorschrift 2.4. umsetzen. Nach 12-stündiger Extraktion mit Essigester die Hälfte der wässrigen Phase 3-4 h mit Palladium auf Aktivkohle als Katalysator hydrieren. Anschliessend am Hochvakuum destillieren und kapillargaschromatographisch untersuchen.

Bedingungen:

Apparat C, Methode 2:

Temp. 1: 150°C Time 1: 3 min Rate: 5°C/min

Temp. 2: 200°C Time 2: 0 Rate: 10°C/min

Temp. 3: 260°C Time 3: 15 min

Inj.: 280°C Det.: 280°C

Retentionszeit der nicht acetylierten Verbindung 58:

4.69 ± 0.02 min

- 2.16. Isolierung einer unbekannten Verbindung mit der Molekularmasse 287 aus einer Umsetzung von HMF 41 mit Prolin:

Je 2g Hydroxymethylfurfural 41 und Prolin in 50 ml Ethanol lösen und 4h am Rückfluss erhitzen. Anschliessend das Lösungsmittel entfernen und den Rückstand schichtchromatographisch reinigen (2 mm, Laufmittel: Methanol/Eisessig 87:13, Rf: 0.3, Detektion mit "Ehrlich s Reagenz"). Die noch mit Prolin verunreinigte Verbindung (vgl. NMR Seite 74) in Methanol lösen und mit Diazomethan versetzen. Nach nochmaliger dünnschichtchromatographischer Reinigung (0.5 mm, Laufmittel und Rf wie oben) können Spektren der zweifach methylierten Verbindung aufgenommen werden.

"287": blassgelbes Öl

¹H-NMR (CD₃OD): Vergl. Abb.12,S.74.

- MS: 287 (100, M⁺), 270 (60), 254 (12), 220 (22),
194 (33), 180 (54), 178 (48), 176 (50).

Durch Umsetzung mit Diazomethan wird die Verbindung
zweifach methyliert:

¹H-NMR (CD₃OD): Vergl. Abb. 12,S. 74.

- MS: 315 (35, M⁺), 301 (46), 270 (80), 192 (100).

3. Untersuchungen zum 4-Desoxyabbauweg

3.1. Ausgangs- und Vergleichssubstanzen:

2-Hydroxyacetylfuran 65:

Die Verbindung wurde nach Literaturangaben (159) synthetisiert.

3.2. Isolierung von 49f (2-Hydroxymethyl-1-methylpyridinium-3-olat) aus einem Umsetzungsgemisch von 2-Hydroxyacetylfuran und Methylammoniumacetat:

1 g 2-Hydroxyacetylfuran in 20 ml Phosphatpuffer (pH7) lösen und 0.75 g Methylammoniumacetat (80 % in Wasser) zugeben. Bei 130-140°C über Nacht autoklavieren. Unpolare Festbestandteile abfiltrieren und nach weitgehender Entfernung des Lösungsmittels den Rückstand schichtchromatographisch reinigen (2 mm, Laufmittel: Methanol, Rf: 0.3). Spektraldaten sind identisch mit der synthetisierten Verbindung (s.u.). Ausbeute 1-2%.

3.3. Synthese von 49f:

Bei 3-Hydroxypyridin nach Literaturangaben (137, 138) mit Formaldehyd die Hydroxymethylgruppe in 2-Position einführen. Anschliessend 100 mg 3-Hydroxy-2-hydroxymethylpyridin in 20 ml propanolisch-wässriger KOH (ca. 2N) mit 120 mg Methyljodid-8 h unter Rückfluss methylieren und schichtchromatographisch reinigen (0.5 mm, Laufmittel: Methanol, Rf: 0.3). Ausbeute 10%.

49f: Farbloses, zähflüssiges Öl

¹H-NMR (CD₃OD): ppm 3.68 (m, 2H), 4.20 (s, 3H), 7.2-8.0 (m, 3H). -MS: Die Verbindung ergab kein auswertbares Massenspektrum. -IR(KBr): 1600, 1570, 1510, 1500, 1360, 1280, 1030, 750, 680 cm⁻¹. -UV (CH₃OH): $\lambda_{\max}$ = 327 nm (lg ϵ = 3.29), 255 nm (lg ϵ = 3.52).

4. Gaschromatographische Untersuchungen zur Bestimmung von Hauptprodukten in Bräunungsgemischen

4.1. Vergleichsubstanzen:

1,6-Anhydrotri-O-acetylglucopyranose:

ist kommerziell erhältlich (Sigma).

Hydroxacetylfuran 65: s. 3.1.

Hydroxymethylfurfural 41: s. 2.1.

Acetylformoin 20: s. 1.1.

2-Formyl-5-hydroxymethyl-1-methylpyrrol 52: s. 2.12.

2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-3-pyranon 7: s. 1.1.

1-Desoxy-1-propylamino-D-fructose 1a sowie Glucosyl-propylamin:

Beide Verbindungen wurden nach Literaturangaben (160) synthetisiert.

Die Acetylierung bzw. Silylierung der Vergleichssubstanzen erfolgte nach 4.2.

4.2. Allgemeine Derivatisierungsverfahren

Acetylierung:

1 g Karamellisierungsschmelze bzw. Bräunungsgemisch in 10 ml Pyridin lösen und 5 ml Acetanhydrid zugeben. Gut durchmischen und über Nacht bei Raumtemp. stehenlassen (Calciumchloridrohr). Anschliessend im Vakuum überschüssiges Pyridin und Acetanhydrid entfernen und den Rückstand am Hochvakuum destillieren.

Silylierung:

300 mg Substanz in dicht verschliessbarem Gefäss in 5 ml Pyridin lösen. 0.5 ml N-, O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid, 0.5 ml HMDS, sowie 3 Tropfen Trifluoressigsäure zugeben, gut verschliessen, durchmischen und über Nacht stehenlassen. Überschüssige Silylierungsreagenzien und Pyridin anschliessend am Vakuum entfernen und Rückstand am Hochvakuum destillieren.

4.3. Untersuchungsmethoden

Gaschromatographische Untersuchungen

wurden am Apparat A (s.I, 5) durchgeführt.

Säule A oder B

Methode A: Temp. 1:190°C Time 1:7 min Rate:5°C/min
Temp. 2:260°C Time 2:15 min
Inj. 280°C, Det. 280°C
Gasdurchfluss 30 ml/min

Methode B: Temp. 1: 90°C Time 1:0 min Rate:5°C/min
Temp. 2:260°C Time 2:5 min
sonst wie Methode A

Enzymatische Untersuchungen wurden mit Testkombinationen von Böhrringer/Mannheim durchgeführt.

4.4. Karamellisierung von Glucose:

50 g Glucose im Becherglas unter Rühren 45-120 min auf 170°C erhitzen. Das Reaktionsgemisch in 100-200 ml heissem Wasser lösen, erkalten lassen und 24 h mit Essigester extrahieren. Den Rückstand der organischen Phase mit Acetanhydrid/Pyridin nach 4.2. acetylieren oder silylieren. Das derivatisierte Gemisch gaschromatographisch untersuchen (Methode A oder B).

Acetyliert man die 120 min lang erhitzte Schmelze direkt ohne Esterextraktion, destilliert und untersucht gaschromatographisch nach Methode B, erhält man das auf Seite 83 abgebildete Chromatogramm. Die dort neben

Glucose (83%) erscheinenden Peaks 68 und 69 lassen sich mit Hilfe des oben beschriebenen Verfahrens auf ca. 50% anreichern. Dies gelingt ebenso durch Aufziehen des Karamells auf Cellulose und anschliessende Elution mit Essigsäureethylester (27, S. 92).

Extrahiert man die Karamellisierungsschmelze mit Methylchlorid, so lässt sich nach Derivatisierung aber auch direkt nach Destillation am Hochvakuum lediglich HMF 41 nachweisen.

4.5. Isolierung und Reinigung von 68 (1,6-Anhydrotri-O-acetylglucopyranose) und 69 (1,6-Anhydrotri-O-acetylglucofuranose):

Gaschromatographische Trennung:

Die nach 4.4 angereicherte Mischung der beiden Anhydrozucker und Glucose gaschromatographisch auftrennen und die beiden Substanzen mit luftgekühlten Glaskapillaren auffangen (Apparat B, Säule A, Methode A). Vereinfacht wird die Trennung, wenn der Zucker bereits hochdruckflüssigkeitschromatographisch abgetrennt ist (s.u.).

Hochdruckflüssigkeitschromatographische Trennung:

Die nach 4.4 angereicherte Mischung über eine RP-18 Umkehrphase hochdruckflüssigchromatographisch auftrennen (Elution mit Methanol/Wasser 7:3). Dadurch gelingt die vollständige Abtrennung der Glucose von den beiden Anhydrozuckern. Mit dem Elutionsmittelgemisch Methanol/Wasser 1:1 gelingt auch die Auftrennung bzw. Anreicherung der einzelnen Anhydrozucker. 68 kristallisiert ab einem Gehalt von über 70% aus.

68: Die Spektraldaten sind identisch mit denen von kommerziell erhältlicher 1,6-Anhydrotri-O-acetylglucopyranose (Sigma).

69: Die Spektraldaten sind identisch mit den in der Literatur angegebenen Daten (144, 145).

¹³C-NMR (CDCl₃): ppm 62,98 t (C-6), 65,58 d, 75,58 d, 75,91 d, 78,82 d, 100,75 d (C-1). -MS (CI: Isobutan): 289 (100, M+1), 229 (20, -CH₃COOH).

4.6. Umsetzungen von Glucose mit primären Aminen:

Äquimolare Mengen Glucose und Methyl- bzw. Propylammoniumacetat (ca.85% in Wasser) 15-20 min auf 120°C erhitzen. Anschliessend über Nacht mit Essigester extrahieren und den Rückstand der organischen Phase nach

4.2. acetylieren bzw. silylieren. Abbildung 14 (S.87) zeigt ein typisches Chromatogramm einer solchen Umsetzung. Durch Zuspitzen von Vergleichssubstanzen (siehe 4.1.) konnten neben Glucose die Verbindungen 1a, 7, 20, 41, 52, 65 und 71 identifiziert werden.

Wird der Rückstand der wässrigen Phase nach 4.2. acetyliert und gaschromatographisch nach 4.3., Methode A untersucht, erhält man das in Abb. 15 dargestellte Chromatogramm mit den Verbindungen 71 und 1 als Hauptbestandteilen.

Literaturverzeichnis

- (1) Kawamura S (1983) ACS Symp 215: 3
- (2) Maillard LC (1912) C R hebdomadaire des Seances Acad Sci 154: 66
- (3) Fors S (1983) ACS Symp 215: 185
- (4) Hurrell RF (1982) Dev Food Sci 3A (Food Flav. Part A): 399
- (5) Ohloff G, Flament J (1978) Heterocycles 11: 663
- (6) Shibamoto T (1980) J Agric Food Chem 28: 237
- (7) Weidemann HL, Mohr W (1970) Lebensm Wiss Technol 3: 23
- (8) Schank K (1972) Synthesis: 176
- (9) Mills FD, Hodge JE, Tjarks CW (1981) J Org Chem 46: 3597
- (10) Tsen CC, Reddy PRK, El-Samahy SK, Gehrke CW (1983) ACS Symp 215: 379
- (11) Öste R, Björk J, Dahlquist A, Jägerstad M, Södin P (1983) ACS Symp 215: 406
- (12) Tucker BW, Riddle V, Liston J (1983) ACS Symp 215: 395
- (13) Barnes W, Spingarn NE, Garvie-Gould C, Vuolo LL, Wang Y, Weisburger JH (1983) ACS Symp 215: 485
- (14) Nagao M, Sato S, Sugimura T (1983) ACS Symp 215: 521

- (15) Pintauro SJ, Lee TC, Chichester CO (1983) ACS Symp 215: 467
- (16) Mester L, Szabados L, Mester M (1983) ACS Symp 215: 451
- (17) Monnier VM, Cerami A (1983) ACS Symp 215: 430
- (18) Garlick RL, Mazer JS, Chylack LTjr, Tung WH, Bunn F (1984) J Clin Invest 74: 1742
- (19) Schleicher E, LMU-München (1985) pers. Mitteilung
- (20) Namiki M, Hayashi T (1983) ACS Symp 215: 21
- (21) Paulsen H, Pflughaupt KW (1980) The Carbohydrates, Chem. and Biochem.: 881 Pigman, Horton Hrsg., New York
- (22) Reynolds TM (1965) Adv Food Res 14: 1, 167
- (23) Nursten HE (1980) Food Chem 6: 263
- (24) Heyns K (1977) Deutsche Lebensm Rundschau 73: 111
- (25) Angrick M, Rewicki D (1980) Chemie in unserer Zeit 14: 149
- (26) Mills FD, Baker BG, Hodge JE (1969) J Agr Food Chem 17: 723
- (27) Hiebl J (1984) Diss München: 4f, 22ff
- (28) Brand J (1894) Chem Ber 27: 806
- (29) Stenhouse J (1862) Ann Chem Pharm 123: 191

- (30) Peratomer A, Tamburello A (1905) Chem Zentralbl II: 680
- (31) Erdmann E, Schäfer C (1910) Chem Ber 43: 2398
- (32) Beittér H (1963) Brot Gebäck 17: 132
- (33) Ledl F, Hiebl J, Severin T (1983) Z Lebensm Unters Forsch 177: 353
- (34) Severin Th, Seilmeier W (1968) Z Lebensm Unters Forsch 137: 4
- (35) Rothmoser J (1981) Diss München: 53ff
- (36) Sugisawa H, Edo H (1964) Chem and Ind: 892
- (37) Peat S, Whelan WJ, Edwards TE, Owen O (1958) J Chem Soc: 586
- (38) Rodd's Chem of Carb Comp, 2. Ed, Vol 1, Part F: 262
- (39) Heyns K, Vogelsang G (1954) Chem Ber 87: 1377
- (40) Ost H (1884) J prakt Chem 29: 62
- (41) Armit JW, Nolan TJ (1931) J Chem Soc: 3025
- (42) Severin T, Loidl A (1976) Z Lebensm Unters Forsch 161: 119
- (43) Backe A (1910) Compt rend 150: 540; 151, 78
- (44) Fisher BE, Hodge JE (1964) J Org Chem 29: 776
- (45) Erbersdobler HF, Anderson TR (1983) ACS Symp 215: 423

- (46) Steinig J, Montag A (1982) Z Lebenm Unters Forsch 174: 453
- (47) Heyns K, Heukeshoven J, Brose KH (1968) Angew Chem 80: 627
- (48) Finot PA, Viani R, Bricout J, Mauron J (1968) Experientia 24: 1097
- (49) Finot PA, Viani R, Bricout J, Mauron J (1969) Experientia 25: 134
- (50) Erbersdobler H (1970) Milchwissenschaft 25: 280
- (51) Sulser H, Büchi W (1969) Lebensm wiss Technol 2: 105
- (52) Schleicher E, Wieland OH (1981) J Clin Chem Clin Biochem 19: 81
- (53) Neuberger A, Sanger F (1943) Biochem J 37: 515
- (54) Zahn H, Huber H, Ditscher W, Wegerle D, Meienhofer J (1956) Chem Ber 89: 407
- (55) Hardy PM, Nicholls AC, Rydon HN (1976) J Chem Soc, Perk Trans 1: 958
- (56) Büser W, Erbersdobler HF (1985) J Chromat 346: 363
- (57) Keeler RF (1975) Lloydia 78: 74
- (58) Eskenazi C, Lhommet G, Richaud MG, Maitte P (1976) J Heterocycl Chem 13: 253
- (59) Wackerbauer K, Narziss L (1981) Brauwissenschaft 34: 1

- (60) Hunter JR, Walden MK, Maifadden WH, Pence JW (1966)
Cereal Sci Today 11: 493, 500
- (61) Morimoto T, Johnson JA (1966) Cereal Chem 43: 627
- (62) Tressl R, Grünewald KG, Helak B (1981) Flavour 81: 397
- (63) Tressl R, Helak B, Rewicki D (1982) Helv Chim Acta 65:
483
- (64) Tressl R, Helak B, Spengler K, Schröder A, Rewicki D
(1985) Liebig's Ann Chem: 2017
- (65) Tressl R (1983) Brauwelt 123: 1758
- (66) Pabst M (1985) Diss Garching
- (67) Pabst HME, Ledl F, Belitz HD (1984) Z Lebensm Unters
Forsch 178: 356
- (68) Pabst HME, Ledl F, Belitz HD (1985) Z Lebensm Unters
Forsch 181: 386
- (69) Ishizu A, Lindberg B, Theander O (1967) Carbohydr Res
5: 329
- (70) Fisher BE, Sinclair HB, Goodwin JC (1983) Carbohydr Res
166: 209
- (71) Unilever NV (1969) Offenlegungsschrift 1932800, Deut-
sches Patentamt Aktz P 1932800.8
- (72) Shu CK, Hagedorn ML, Mookherjee BD, Ho CT (1985) J
Agric Food Chem 33: 638

- (73) (1978) Bull Soc Chim Belg 87: 223, 229, 299, 525
- (74) Fujimaki M, Kato S, Kurata T (1969) Agric Biol Chem 33: 1144
- (75) Tressl R (1986): Noch unveröffentlichte Ergebnisse
- (76) Ledl F, Fritsch G (1984) Z Lebensm Unters Forsch 178: 41
- (77) Supp W (1979) Diss München
- (78) Hodge JE, Rist CE (1953) J Am Chem Soc 75: 316
- (79) Weygand F, Simon H, Bitterlich W, Hodge JE, Fisher BE (1959) Tetrahedron 6: 123
- (80) Simon H (1962) Chem Ber 95: 1003
- (81) Simon H, Heubach G (1965) Chem Ber 98: 3703
- (82) Tressl R, Rewicki D, Helak B, Kamperschröer H, Martin N (1985) J Agric Food Chem 33: 919
- (83) Blanksma JJ (1909) Chem Weekblad 6: 1047; Chem Zentralblatt (1910) 81: 539
- (84) Kiermayer (1895) Chem Zeitg 19: 1004
- (85) Schormüller J (1974) Lehrbuch der Lebensmittelchemie 2. Aufl, Springer Berlin, S.84
- (86) ibid. S. 560, 569
- (87) Turner JH, Rebers PA, Barrick PL, Cotton RH (1954) Analyt Chem 26: 898

- (88) Anet E (1964) Adv Carbohyd Chem 19: 181
- (89) El Khadem H, Horton D, Meshreki MH, Nashed MA (1971) Carbohyd Res 17: 183
- (90) Madson MA, Feather MS (1981) Carbohyd Res 94: 183
- (91) Jurch GR jr, Tatum JH (1970) Carbohyd Res 15: 233
- (92) Maga JA (1981) J Agric Food Chem 29: 691
- (93) Rizzi GP (1974) J Agric Food Chem 22: 279
- (94) Maga JA (1981) J Agric Food Chem 29: 895
- (95) Buttery RG, Ling LC, Teranishi R, Mon TR (1977) J Agric Food Chem 25: 1227
- (96) Tang J, Jin QZ, Shen G, Ho C, Chang S (1983) J Agric Food Chem 31: 1282
- (97) Watanabe K, Sato Y (1971) J Agric Food Chem 19: 1017
- (98) Walradt JP, Pittet AO, Kinlin TE, Muralidhara R, Sanderson A (1971) J Agric Food Chem 19: 972
- (99) Kinlin TE, Muralidhara R, Pittet AO, Sanderson A, Walradt JP (1972) J Agric Food Chem 20: 1021
- (100) Goldmann IN, Seibl J, Flament I, Gautschi F, Winter M, Willhalm B, Stoll M (1967) Helv Chim Acta 50, 694
- (101) Suyama K, Adachi S (1980) J Agric Food Chem 22: 264
- (102) Lien YC, Nawar WW (1974) J Food Sci 39: 914

- (103) Aso K (1939) Bull Inst Phys Chem Research 18: 171;
C.A. 34: 3782
- (104) Aso K (1940) J Agric Chem Soc Jpn 16: 249; C.A. 34:
6278
- (105) Tsuchida H, Komoto M, Kato H, Fujimaki M (1973) Agric
Biol Chem 37: 403
- (106) Tsuchida H, Komoto M, Kato H, Kurata T, Fujimaki M
(1976) Agric Biol Chem 40: 2051
- (107) Olsson K, Pernemalm P, Theander O (1978) Acta Chem
Scand B32: 249
- (108) Shimizu Y, Natsuto S, Mizunuma Y, Okada Y (1970) J
Jpn Soc Food Nutr 23: 276; FSTA 3 11 M: 1207
- (109) Severin T, Bräutigam KH (1973) Chem Ber 106: 2943
- (110) Zincke T, Mühlhausen G (1905) Ber deut chem Ges 38:
3824
- (111) Foley WM jr, Sanford GE, McKennis H jr (1952) J Am
Chem Soc 74: 5489
- (112) Undheim K, Greibrokk T (1969) Acta Chem Scand 23:
2475
- (113) Ashcroft WR, Joule JA (1981) Heterocycles 16: 1883
- (114) Lyle RE, Anderson PS (1966) Adv Heterocycl Chem 6: 45
- (115) Kawase S, Hirose K, Ukai S (1981) J Chromat 215: 265

- (116) Karrer P, Kahnt FW, Epstein R, Jaffe W, Ishii T
(1938) *Helv Chim Acta* 21: 223
- (117) Shapiro LS, Weinberg K, Freedmann L (1959) *J Am Chem Soc* 81: 5140
- (118) Katrizky AR, Takeuchi Y (1971) *J Chem Soc (C)*: 874
- (119) Decker H (1893) *J Prakt Chem* 47: 29
- (120) Golding S, Katrizky AR (1965) *Can J Chem* 43: 1250
- (121) Weber H (1975) *Arch Pharm* 308: 331
- (122) Möhrle H, Weber H (1970) *Tetrahedron* 26: 3779
- (123) Tosato ML, Soccorsi L, Cignitti M (1979) *Gazz chim Ital* 109: 387
- (124) Papadopoulos EP, Jarrar A, Issidorides CH (1966) *J Org Chem* 31: 615
- (125) Mancera O, Rosenkranz G, Sondheimer F (1953) *J Chem Soc*: 2189
- (126) Vögeli U, v.Philipsborn W (1973) *Org Magn Reson* 5: 551
- (127) Paolini L, Cignitti M, Tosato ML (1974) *Org Magn Res* 6: 469
- (128) Nyhammar T, Olsson K, Pernemalm P (1983) *Acta Chem Scand B* 37: 879
- (129) Elming N, Clauson-Kaas N (1956) *Acta Chem Scand* 10: 1603

- (130) Paulsen H, Todt K, Heyns K (1964) Liebigs Ann Chem 679: 169
- (131) Tressl R, Grünewald KG, Kersten E, Rewicki D (1985) J Agric Food Chem 33: 1137
- (132) Miller RE, Cantor SM (1952) J Am Chem Soc 74: 5236
- (133) Shaw PE, Berry RE (1977) J Agric Food Chem 25: 641
- (134) Shaw PE, Tatum JH, Berry RE (1967) Carbohydr Res 5: 266
- (135) Harris DW, Feather MS (1972) Tetrahed Lett 47: 4813
- (136) Heyns K, Hauber R (1970) Liebigs Ann Chem 733: 159
- (137) Urbanski T (1946) J Chem Soc: 1104
- (138) Murakami Y, Sumamoto J, Sadamori H, Kondo H, Tagahi M (1970) Bull Chem Soc Jpn 43: 2518
- (139) Nyhammar T, Olsson K, Pernemalm PA (1983) ACS Symp 215: 72
- (140) Gardiner D (1966) J Chem Soc: 1473
- (141) Rodd's Chem of Carbon Comp, 2. Ed, Vol 1, Part F: 363
- (142) Garcia Ruiz PA, Soler A, Tarraga Tomas A (1981) Ann de Quimica 78: 415
- (143) Fischer E (1890) Berichte 23: 3687
- (144) Dimler RJ, Davis HA, Hilbert GE (1946) J Am Chem Soc 68: 1377

- (145) Shafizadeh F, Fu YL (1973) Carbohydr Res 29: 113
- (146) Budessinsky M, Trnka T, Cerny M (1979) Coll Czech Chem Comm 44: 1949
- (147) Ritchie G, Cyr N, Perlin A (1976) Can J Chem 54: 2301
- (148) Hayase F, Kato H (1985) Agric Biol Chem 49: 467
- (149) Severin T, Hiebl J, Popp-Ginsbach H (1984) Z Lebensm Unters Forsch 178: 284
- (150) Goodwin JC (1985) Carbohydr Res 143: 61
- (151) Beck J, Ledl F (1986) LMU München: unveröff. Ergebnisse
- (152) Machell G, Richards GN (1960) J Chem Soc: 1938
- (153) Ouweland GAM van den, Peer HG (1970) Recueil 89: 750
- (154) Hodge JE, Nelson EC (1961) Cereal Chem 38: 207
- (155) Yabuta T (1924) J Chem Soc 125: 575
- (156) Brown MG (1956) J Chem Soc: 2558
- (157) Goto R, Myiagi Y, Inokawa H (1963) Bull Chem Soc Jpn 36: 147
- (158) Bonner TG, Bourne EJ, Ruszkiewicz M (1960) J Chem Soc 787
- (159) Kipnis F, Soloway H, Ornfelt J (1948) J Am Chem Soc 70: 142
- (160) Micheel F, Frowein A (1957) Chem Ber 90: 1599

Lebenslauf

Am 23. 12. 1959 wurde ich, Otto Paul Friedrich Pachmayr als Sohn des Lebensmittelchemikers Dr. Friedrich Pachmayr und seiner Frau Ursula, geb. Ackermann, ebenfalls Lebensmittelchemikerin, in München geboren.

Hier besuchte ich von 1966 bis 1970 die Volksschule an der Camerloherstrasse. Im Anschluss daran besuchte ich von 1970 bis 1979 das Ludwigsgymnasium in München, wo ich am 27. 6. 1979 das Abitur bestand.

Zum WS 1979/80 begann ich das Studium der Lebensmittelchemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Am 6. 11. 1981 bestand ich die lebensmittelchemische Vorprüfung und am 12. 12. 1983 das 1.Staatsexamen.

Seit 15. 12. 1983 arbeite ich unter Anleitung von Professor Dr. Th. Severin am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der LMU-München an der vorliegenden Dissertation.

Am 11. Oktober 1985 heiratete ich die Apothekerin Elisabeth Pachmayr, geb. Lindemann.



